



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROCÁPSULAS  
MEDIANTE GELIFICACIÓN IÓNICA EXTERNA, DE LA FRACCIÓN  
ALCALOIDEA DE *Ilex guayusa* CON ALGINATO SÓDICO, Y SU  
UTILIZACIÓN EN LA FORMULACIÓN DE UNA FORMA DE  
DOSIFICACIÓN SÓLIDA”**

**TESIS DE GRADO**

**PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**  
**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**PRESENTADO POR:**

**CÉSAR AUGUSTO HERNÁNDEZ DÁVILA**

**TUTOR**

**BQF. DIEGO VINUEZA, M.Sc.**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2014**

## ***DEDICATORIA***

*A mi esposa Viviana y mi hijo Gael por formar parte de mi vida de manera incondicional.*

*A Dios y a mi madre con mucho amor y cariño ya que han sido el pilar fundamental en mi vida, y mi apoyo incondicional en todo momento para lograr todas mis metas.*

*A mis hermanos, Eduardo, Francisco y Esthela por apoyarme en todo momento siendo mis amigos, y mis consejeros.*

*A mi familia por ser mi alegría.*

## **AGRADECIMIENTO**

*A Dios por haberme dado la existencia, y ser mi fortaleza en los momentos más duros, permitiéndome así llegar al final de la carrera.*

*A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por la formación académica que me ha brindado.*

*Al BQF. Carlos Pazmiño, M.Sc., BQF. Diego Vinuesa, M.Sc. y BQF. Fausto Contero quienes han orientado en todo momento la realización de esta investigación.*

*Al Dr. Carlos Pilamunga, Ph.D y al Lic. Fausto Tapia por su valiosa colaboración y asesoramiento en la realización de la presente Tesis.*

*A toda mi familia por ser el soporte incondicional en los retos que se han presentado.*

*A mis amigos, por haberme apoyado siempre y por brindarme su amistad sincera.*

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROCÁPSULAS MEDIANTE GELIFICACIÓN IÓNICA EXTERNA, DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE *Ilex guayusa* CON ALGINATO SÓDICO, Y SU UTILIZACIÓN EN LA FORMULACIÓN DE UNA FORMA DE DOSIFICACIÓN SÓLIDA”, de responsabilidad del señor egresado César Augusto Hernández Dávila, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. César Ávalos <b>DECANO FAC. CIENCIAS</b>	_____	_____
Dr. Francisco Portero <b>DIRECTOR DE ESCUELA</b>	_____	_____
BQF. Diego Vinuesa, M.Sc. <b>DIRECTOR DE TESIS</b>	_____	_____
BQF. Fausto Contero <b>MIEMBRO DE TRIBUNAL</b>	_____	_____
Ing. Eduardo Tenelanda <b>DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACIÓN</b>	_____	_____

**NOTA DE TESIS ESCRITA** \_\_\_\_\_

Yo, **César Augusto Hernández Dávila**, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

---

**CÉSAR AUGUSTO HERNÁNDEZ DÁVILA**

## RESUMEN

La investigación consistió en elaborar microcápsulas mediante gelificación iónica externa de la fracción alcaloidea de *Ilex guayusa* L., y su presentación como forma farmacéutica, en el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Los alcaloides totales utilizados fueron obtenidos por percolación, y se identificó a la cafeína como marcador químico mediante cromatografía (HPLC) de la fracción alcaloidea. Las microcápsulas se elaboraron utilizando alginato de sodio, cloruro de calcio y los alcaloides totales como ingrediente activo, por espectroscopia infrarroja se descartó la presencia de interacción o formación de complejos entre el recubrimiento y el activo.

Se optó por cápsulas blandas de gelatina como forma farmacéutica donde las microcápsulas en los estudios de disolución demostraron poseer un comportamiento de gastroprotección en pH 2,0 y liberación modificada inmediata en pH 7,4.

La metodología desarrollada en esta investigación es práctica de realizar, convirtiéndose en un sistema eficaz de elaboración de microcápsulas que cumplen con todos los ensayos de control de calidad realizados.

Se recomienda realizar un estudio de biodisponibilidad y la implementación de esta metodología en industria farmacéutica.

## SUMMARY

The research consisted of developing microcapsules by using external ionic gelling of the alkaloid fraction of *Ilex guayusa* L., and its presentation as pharmaceutical form, in the Laboratory of Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy and Biochemistry of the Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Used total alkaloids were obtained by percolation, and caffeine as a marker chemist using chromatography (HPLC) of the alkaloid fraction was identified. The microcapsules were prepared using sodium alginate, chloride calcium and total alkaloids as active ingredient, by infrared spectroscopy was ruled out the presence of interaction or formation of complexes between the coating and the active.

Opted for soft gelatin capsules as pharmaceutical form where the microcapsules in dissolution studies showed to own a behavior of gastroprotection at pH 2.0 and modified release at pH 7,4.

The methodology developed in this research is practical to perform, turning it into an effective system of preparation of microcapsules that comply with all the quality control tests.

It is recommended a bioavailability study and the implementation of this methodology in the pharmaceutical industry.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

GABA	Ácido gamma-aminobutírico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
cm	Centímetro
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
°C	Grados Celsius
g	Gramo
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
IR	Infrarrojo
K	Potasio
kg	Kilogramo
$\lambda$	Longitud de onda infrarrojo
min	Minuto
$\mu\text{m}$	Micrometro
mg	Miligramo
ml	Mililitro
ppm	Parte por millón
TLC	Cromatografía en Capa Fina
UV	Ultravioleta



## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

ÍNDICE DE ANEXOS

INTRODUCCIÓN

1.	<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	- 3 -
1.1.	GUAYUSA .....	- 3 -
1.1.1.	DEFINICIÓN.....	- 3 -
1.1.2.	TAXONOMÍA.....	- 3 -
1.1.3.	UBICACIÓN .....	- 4 -
1.1.4.	APLICACIONES .....	- 4 -
1.1.5.	COMPOSICIÓN.....	- 4 -
1.2.	CAFEÍNA.....	- 5 -
1.2.1.	DEFINICIÓN.....	- 5 -
1.2.2.	CARACTERÍSTICAS .....	- 5 -
1.2.3.	APLICACIONES .....	- 6 -
1.2.4.	MECANISMO DE LA CAFEÍNA .....	- 6 -
1.3.	FORMAS FARMACÉUTICAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA DE ADMINISTRACIÓN ORAL.....	- 7 -
1.3.1.	DEFINICIÓN.....	- 7 -
1.3.2.	CLASIFICACIÓN SEGÚN EL MECANISMO GENERAL DE ACCIÓN	- 7 -
1.3.3.	CLASIFICACIÓN SEGÚN EL TIPO DE LIBERACIÓN .....	- 8 -

1.3.3.1.	FORMAS FARMACÉUTICAS DE LIBERACIÓN SOSTENIDA .....	- 8 -
1.3.3.2.	FORMAS FARMACÉUTICAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA.....	- 8 -
1.3.3.3.	FORMAS FARMACÉUTICAS DE LIBERACIÓN REPETIDA .....	- 8 -
1.3.3.4.	FORMAS FARMACÉUTICAS DE LIBERACIÓN RETARDADA.....	- 8 -
1.4.	MICROENCAPSULACIÓN .....	- 9 -
1.4.1.	DEFINICIÓN.....	- 9 -
1.4.2.	TIPO DE MICROCÁPSULAS .....	- 10 -
1.4.2.1.	MICROCÁPSULAS .....	- 10 -
1.4.2.2.	MICROESFERAS.....	- 10 -
1.4.2.3.	MICROCÁPSULAS HOMOGÉNEAS Y HETEROGÉNEAS.....	- 10 -
1.4.3.	APLICACIÓN .....	- 11 -
1.4.4.	MÉTODOS DE MICROENCAPSULACIÓN .....	- 13 -
1.5.	GELIFICACIÓN IÓNICA.....	- 13 -
1.5.1.	TIPOS DE GELIFICACIÓN IÓNICA.....	- 14 -
1.5.1.1.	GELIFICACIÓN IÓNICA EXTERNA .....	- 14 -
1.5.1.2.	GELIFICACIÓN IÓNICA INTERNA.....	- 14 -
1.5.2.	GELIFICACIÓN IÓNICA EXTERNA CON ALGINATO DE SODIO ...	- 15 -
1.5.3.	MECANISMOS DE GELIFICACIÓN IÓNICO CON ALGINATO .....	- 15 -
2.	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	- 17 -
2.1.	LUGAR DE REALIZACIÓN .....	- 17 -
2.2.	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS .....	- 17 -
2.2.1.	MATERIAL VEGETAL.....	- 17 -
2.2.2.	MATERIALES DE LABORATORIO.....	- 17 -
2.2.3.	EQUIPOS .....	- 18 -
2.2.4.	REACTIVOS .....	- 18 -
2.3.	TÉCNICAS Y MÉTODOS .....	- 19 -

2.3.1.	CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA CRUDA.....	- 19 -
2.3.1.1.	DETERMINACIÓN DE HUMEDAD .....	- 19 -
2.3.1.2.	DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES.....	- 20 -
2.3.1.3.	DETERMINACIÓN DE CENIZAS SOLUBLES .....	- 20 -
2.3.1.4.	DETERMINACIÓN DE CENIZAS INSOLUBLES .....	- 21 -
2.3.2.	EXTRACCIÓN DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE <i>Ilex guayusa</i> L-	21 -
2.3.2.1.	PERCOLACIÓN .....	- 22 -
2.3.2.2.	DIGESTIÓN ÁCIDA.....	- 22 -
2.3.3.	CONTROL DE CALIDAD DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA.....	- 23 -
2.3.3.1.	DESCRIPCIÓN ORGANOLÉPTICA DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA... ..	- 23 -
2.3.3.2.	DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS .....	- 23 -
2.3.3.2.1.	DETERMINACIÓN DE pH.....	- 23 -
2.3.3.2.2.	DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN. ....	- 23 -
2.3.3.2.3.	TAMIZAJE FITOQUÍMICO .....	- 24 -
2.3.3.3.	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO EN CAPA FINA (TLC) DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA .....	- 25 -
2.3.3.4.	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC) DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA .....	- 25 -
2.3.3.5.	ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO ULTRAINVISIBLE (UV) DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA .....	- 26 -
2.3.4.	ELABORACIÓN DE MICROCÁPSULAS POR GELIFICACIÓN IÓNICA EXTERNA .....	- 27 -
2.3.4.1.	SOLUCIÓN DE ALGINATO DE SODIO .....	- 27 -
2.3.4.2.	SOLUCIÓN DE CLORURO DE CALCIO.....	- 27 -
2.3.4.3.	MICROCÁPSULAS DE ALGINATO DE CALCIO.....	- 27 -
2.3.4.4.	MICROENCAPSULACIÓN DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE <i>Ilex guayusa</i> L. ....	- 28 -

2.3.5.	CARACTERIZACIÓN DE MICROCÁPSULAS .....	- 28 -
2.3.5.1.	HUMEDAD .....	- 28 -
2.3.5.2.	ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA Y MORFOLOGÍA .....	- 29 -
2.3.5.3.	RENDIMIENTO DE PRODUCCIÓN .....	- 29 -
2.3.5.4.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PRINCIPIO ACTIVO.....	- 29 -
2.3.5.5.	EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN .....	- 29 -
2.3.5.6.	ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA .....	- 29 -
2.3.6.	ELABORACIÓN DE LA FORMA DE DOSIFICACIÓN SOLIDA .....	- 30 -
2.3.7.	CONTROL DE CALIDAD DE FORMA DE DOSIFICACIÓN SOLIDA -	30 -
2.3.7.1.	UNIFORMIDAD DE CONTENIDO .....	- 30 -
2.3.7.2.	UNIFORMIDAD DE MASA .....	- 30 -
2.3.7.3.	ENSAYO DE DISOLUCIÓN .....	- 31 -
2.3.7.3.1.	ENSAYO DE DISOLUCIÓN EN pH 2,0.....	- 31 -
2.3.7.3.2.	ENSAYO DE DISOLUCIÓN EN PH 7,4 .....	- 31 -
2.3.7.3.3.	ENSAYO DE DISOLUCIÓN CONTINUA pH 2 – pH 7,4.....	- 32 -
3.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	- 33 -
3.1.	CONTROL DE CALIDAD DE LA ESPECIE VEGETAL .....	- 33 -
3.2.	CONTROL DE CALIDAD DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA.....	- 34 -
3.3.	IDENTIFICACIÓN DEL MARCADOR QUÍMICO.....	- 35 -
3.3.1.	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO EN CAPA FINA (TLC) DE CAFEÍNA.....	- 35 -
3.3.2.	CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC) DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA .....	- 36 -
3.3.3.	ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO ULTRAVIOLETA (UV) DE LOS ALCALOIDES TOTALES.....	- 36 -
3.4.	CARACTERIZACIÓN DE MICROCÁPSULAS .....	- 38 -
3.4.1.	ENSAYO DE RENDIMIENTO.....	- 38 -

3.4.2.	DETERMINACIÓN DE HUMEDAD .....	- 39 -
3.4.3.	MORFOLOGÍA Y TAMAÑO DE PARTÍCULA .....	- 39 -
3.4.4.	RENDIMIENTO DE PRODUCCIÓN .....	- 40 -
3.4.5.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DEL PRINCIPIO ACTIVO .....	- 41 -
3.4.6.	EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN .....	- 41 -
3.4.7.	ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA .....	- 42 -
3.5.	CONTROL DE CALIDAD DE FORMA SOLIDA DE DOSIFICACIÓN .....	- 46 -
3.5.1.	UNIFORMIDAD DE CONTENIDO .....	- 46 -
3.5.2.	UNIFORMIDAD DE MASA. ....	- 46 -
3.5.3.	ENSAYO DE DISOLUCIÓN .....	- 48 -
3.5.3.1.	ENSAYO DE DISOLUCIÓN EN pH 2,0.....	- 49 -
3.5.3.2.	ENSAYO DE DISOLUCIÓN EN pH 7,4.....	- 50 -
3.5.3.3.	ENSAYO DE DISOLUCIÓN CONTINUA pH 2,0 – pH 7,4 .....	- 52 -
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	- 54 -
	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	- 55 -
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	- 56 -
	<b>ANEXOS</b> .....	- 61 -

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. MÉTODOS DE MICROENCAPSULACIÓN .....	- 13 -
CUADRO 2. RESULTADOS DEL CONTROL DE CALIDAD DE <i>ILEX GUAYUSA L.</i> DE LA DROGA SECA Y PULVERIZADA. ....	- 33 -
CUADRO 3. RESULTADOS DE LA DESCRIPCIÓN ORGANOLÉPTICA, PARÁMETROS FÍSICOS Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE LA <i>ILEX GUAYUSA L.</i> .....	- 34 -
CUADRO 4. CUANTIFICACIÓN DE CAFÉINA POR HPLC DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA .....	- 36 -
CUADRO 5. ABSORBANCIAS OBTENIDAS A PARTIR DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES. ....	- 37 -
CUADRO 6. ENSAYOS DE PRODUCCIÓN SIN PRINCIPIO ACTIVO Y EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO.....	- 38 -
CUADRO 7. PORCENTAJE DE HUMEDAD POR PERDIDA EN DESECACIÓN DE MICROCÁPSULAS CON LA FRACCIÓN ALCALOIDEA.....	- 39 -
CUADRO 8. ENSAYOS DE PRODUCCIÓN CON PRINCIPIO ACTIVO Y EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO.....	- 40 -
CUADRO 9. CONCENTRACIÓN DEL CONTENIDO DE ALCALOIDES TOTALES.. .....	- 41 -
CUADRO 10. CONCENTRACIÓN DEL CONTENIDO DE ALCALOIDES TOTALES.. .....	- 42 -
CUADRO 11. BANDAS DE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DE MICROCÁPSULAS DE ALGINATO DE SODIO.....	- 43 -
CUADRO 12. BANDAS DE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DE ALCALOIDES TOTALES DE <i>ILEX GUAYUSA L.</i> .....	- 44 -
CUADRO 13. BANDAS DE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DE MICROCÁPSULAS CON LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE <i>ILEX GUAYUSA L.</i> .....	- 45 -
CUADRO 14. UNIFORMIDAD DE CONTENIDO DE ALCALOIDES TOTALES DE MICROCÁPSULAS OPTIMIZADAS.....	- 46 -
CUADRO 15. UNIFORMIDAD DE MASA DE CÁPSULAS DE GELATINA LOTE 4. ....	- 47 -

CUADRO 16. UNIFORMIDAD DE MASA DE CAPSULAS DE GELATINA LOTE 5..	
.....	- 48 -
CUADRO 17. ENSAYO DE DISOLUCIÓN EN TAMPÓN pH 2,0 DE CAPSULAS DE GELATINA CON LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE <i>Ilex guayusa</i> L. DEL LOTE 5.....	- 49 -
CUADRO 18. ENSAYO DE DISOLUCIÓN EN TAMPÓN pH 7,4 DE CAPSULAS DE GELATINA CON LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE <i>Ilex guayusa</i> L. DEL LOTE 5.....	- 51 -
CUADRO 19. ENSAYO DE DISOLUCIÓN CONTINUA EN TAMPÓN pH 2,0 - pH 7,4 DE CAPSULAS DE GELATINA CON LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE <i>Ilex guayusa</i> L. DEL LOTE 5. ....	- 52 -

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. CAFEÍNA Y DERIVADOS. ....	- 5 -
FIGURA 2. ILUSTRACIÓN DE MICROCÁPSULAS Y MICROESFERAS .....	- 10 -
FIGURA 3. DIFERENCIAS ESTRUCTURALES ENTRE MICROCÁPSULAS, MICROESFERAS Y MICROCÁPSULA HOMOGÉNEA. ....	- 11 -
FIGURA 4. ESTRUCTURAS INTERNAS DE MICROCÁPSULAS Y MICROESFERAS.....	- 12 -
FIGURA 5. FORMACIÓN ALGINATO DE CALCIO.....	- 16 -



## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. PERFILES DE CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE FÁRMACOS	- 9 -
GRÁFICO 2. CURVA DE ABSORBANCIA Vs CONCENTRACIÓN DE ALCALOIDES TOTALES.....	- 37 -
GRÁFICO 3. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DE MICROCÁPSULAS DE ALGINATO DE SODIO.....	- 42 -
GRÁFICO 4. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DE ALCALOIDES TOTALES DE <i>ILEX GUAYUSA L.</i> .....	- 44 -
GRÁFICO 5. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DE MICROCÁPSULAS CON LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE <i>ILEX GUAYUSA L.</i> .....	- 45 -
GRÁFICO 6. PERFIL DE DISOLUCIÓN A pH 2,0 DE MICROCÁPSULAS DE ALGINATO DE CALCIO CON FRACCIÓN ALCALOIDEA. ....	- 50 -
GRÁFICO 7. PERFIL DE DISOLUCIÓN A pH 7,4 DE MICROCÁPSULAS DE ALGINATO DE CALCIO CON FRACCIÓN ALCALOIDEA. ....	- 51 -
GRÁFICO 8. PERFIL DE DISOLUCIÓN CONTINUO CON pH 2,0 - pH 7,4 DE MICROCÁPSULAS CON LA FRACCIÓN ALCALOIDEA. ....	- 53 -

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No 1. CROMATOGRAFÍAS EN CAPA FINA DE ALCALOIDES TOTALES <i>ILEX GUAYUSA L.</i> .....	- 35 -
FOTOGRAFÍA No 2. MICROCÁPSULA AL 2 % DE ALGINATO DE CALCIO QUE CONTIENE ALCALOIDES TOTALES. ....	- 39 -
FOTOGRAFÍA No 3. MICROCÁPSULA AL 2,5 % DE ALGINATO DE CALCIO QUE CONTIENE ALCALOIDES TOTALES. ....	- 40 -

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N 1. HOJAS DE <i>Ilex guayusa</i> L. SECAS Y PULVERIZADAS .....	- 61 -
ANEXO N 2. EXTRACTOS POR PERCOLACIÓN Y DIGESTIÓN ÁCIDA .....	- 61 -
ANEXO N 3. DESCOLORIFICACIÓN DE EXTRACTOS CON CICLO HEXANO- 62 -	
ANEXO N 4. EXTRACCIÓN DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA CON CLOROFORMO .....	- 62 -
ANEXO N 5. ALCALOIDES TOTALES DE <i>Ilex guayusa</i> L.....	- 62 -
ANEXO N 6. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA....	- 63 -
ANEXO N 7. EQUIPO ESPECTROFOTÓMETRO ULTRAVIOLETA UV –HEYIOS THERMO ELECTRON CORPORATION .....	- 63 -
ANEXO N 8. EQUIPO DE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA - HPLC SHIMADZU LC-10 Ai A 254 NM .....	- 64 -
ANEXO N 9. EQUIPO DE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA JASCO FT/IR-4100... .....	- 64 -
ANEXO N 10. DISOLUTOR MARCA VANKEL 6010 .....	- 64 -
ANEXO N 11. MICROSCOPIO OLIMPUS CX31 .....	- 65 -
ANEXO N 12. AGITADOR MAGNÉTICO .....	- 65 -
ANEXO N 13. ENCAPSULADORA MANUAL.....	- 65 -
ANEXO N 14. MICROCÁPSULAS DE ALGINATO DE SODIO .....	- 66 -
ANEXO N 15. CÁPSULAS BLANDAS DE GELATINA QUE CONTIENEN LAS MICROCÁPSULAS .....	- 67 -
ANEXO N 16. BARRIDO DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE <i>Ilex guayusa</i> L.... .....	- 68 -
ANEXO N 17. CURVA DE CALIBRACIÓN POR ESPECTROSCOPIA UV.....	- 69 -
ANEXO N 18. DATOS DE ESPECTROSCOPIA UV DE LA CONCENTRACIÓN CONTENIDA DE ALCALOIDES TOTALES DEL LOTE 4 Y LOTE 5... .....	- 70 -
ANEXO N 19. UNIFORMIDAD DE CONTENIDO POR ESPECTROSCOPIA UV DE ALCALOIDES TOTALES DE MICROCÁPSULAS OPTIMIZADAS DEL LOTE 4 Y LOTE 5.....	- 70 -
ANEXO N 20. DATOS POR ESPECTROSCOPIA UV DEL ENSAYO DE DISOLUCIÓN pH 2,0 .....	- 71 -

ANEXO N 21. DATOS POR ESPECTROSCOPIA UV DEL ENSAYO DE DISOLUCIÓN pH 7,4 .....	- 71 -
ANEXO N 22. DATOS POR ESPECTROSCOPIA UV DEL ENSAYO DE DISOLUCIÓN CONTINUA pH 2,0 - pH 7,4 .....	- 72 -
ANEXO N 23. CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC) DE CAFEÍNA ESTÁNDAR .....	- 72 -
ANEXO N 24. CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC) DE FRACCIÓN ALCALOIDEA DE <i>ILEX GUAYUSA L.</i> .....	- 73 -

## INTRODUCCIÓN

El primer registro de microencapsulación es del año 1931, con publicaciones científicas de microcápsulas elaboradas a base de gelatina, según un procedimiento que se lo denominó “coacervación”.<sup>1</sup>

Entendiendo que la microencapsulación no se limita solo al campo farmacéutico, sino que por su versatilidad se extiende a varios campos, como la industria alimentaria, la industria agrícola, elaboración de pesticidas, manejo de sustancias biológicas, etc.<sup>1</sup> Todo esto con el objetivo de conseguir una liberación modificada del principio activo.

La técnica de microencapsulación que se elija depende directamente del principio activo, de sus propiedades físico - químicas, del tipo de matriz que formaran, y de la liberación deseada.<sup>2</sup>

En esta investigación se seleccionó la gelificación iónica externa que es un tipo de microencapsulación que permite obtener sistemas de liberación controlada, sostenida y de protección para el principio activo o sustancia de interés. Forma una cobertura que previene la oxido-reducción para su conservación o para evitar reacciones no deseadas con fluidos biológicos antes de que el fármaco pueda ejercer el efecto, y en algunos casos sirviendo de barrera para proteger compuestos fotosensibles.<sup>3</sup>

Este método contiene compuestos algínicos que son polisacáridos lineales no ramificados, conteniendo principalmente ácido (1,4')  $\beta$ -D-manurónico y ácido  $\alpha$ -L-glucorónico siendo los polímeros más utilizados en la microencapsulación.<sup>4</sup>

---

<sup>1</sup> FANGER, G. et al. (1974). Microencapsulation processe and applications, pp. 245-265.

<sup>2</sup> LOPRETTI, M. et al. (2007). Microencapsulación de compuestos de actividad biológica, pp. 19.

<sup>3</sup> LAMAS, M. et al. (1998). Hydrogel microspheres for flutamide obtained by múltiple emulsions, pp. 375-378.

<sup>4</sup> GOMBOTZ, WR. (1998). Protein release from alginate matrices, pp. 267-285.

La *Ilex guayusa Loess* es una planta ancestral usada por comunidades del oriente ecuatoriano, que en la actualidad sabemos tiene un alto contenido de cafeína, la cual le confiere propiedades de interés como las analgésicas, termogénicas y diuréticas.<sup>5</sup>

Por esta razón tomamos este vegetal con el objeto de llevarlo a un nuevo nivel tecnológico con los beneficios de la microencapsulación.

La presente investigación se llevó a cabo con el objetivo de aislar la fracción alcaloidea de *Ilex guayusa Loess* por diferentes métodos de extracción y purificación tomando como marcador la cafeína identificándola por procedimientos cromatográficos y espectroscópicos UV e IR.

Se estableció la metodología de microencapsulación por gelificación iónica externa para la fracción alcaloidea de *Ilex guayusa Loess* según el comportamiento del material de cobertura y el principio activo para la obtención de procesos de manufactura eficientes evaluados mediante la caracterización de las microcápsulas elaboradas.

Lo más adecuado es el empleo de cápsulas de gelatina como la forma de dosificación sólida que sirven de vehículo para contener las microcápsulas optimizadas con la fracción alcaloidea.

---

<sup>5</sup> PACHA J., Ana G. (2012). Comprobación del efecto adelgazante de la tintura de guayusa (*Ilex guayusa*) en ratones (*Mus musculus*) con sobrepeso inducido, pp. 5-8.

# CAPITULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. GUAYUSA

#### 1.1.1. DEFINICIÓN

Su nombre científico es *Ilex guayusa* Loess, que en la amazonia ecuatoriana en castellano es reconocida como guayusa. Es un árbol nativo de la zona amazónica donde se desarrolla de manera silvestre, y también se la puede encontrar en ciertos lugares subtropicales, según registros del Herbario de Loja la guayusa está presente en varias provincias como Sucumbíos, Napo, Pastaza, Morona Santiago, Zamora Chinchipe, y de manera inusual, en las provincias de Pichincha y Tungurahua.<sup>6</sup>

Posee un tronco grande y muy ramificado; posee hojas de hasta 15 cm de longitud y 7 cm de ancho con un fuerte olor particular, y tiene un fruto de tipo globuloso. Sus hojas contienen la más alta concentración de cafeína de todas las plantas conocidas.<sup>6</sup>

#### 1.1.2. TAXONOMÍA

Clasificación botánica:

<b>Nombre Científico</b>	<i>Ilex guayusa</i>
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Celastrales
<b>Familia</b>	Aquifoliaceae
<b>Género</b>	<i>Ilex</i>
<b>Epíteto Específico</b>	Guayusa
<b>Autor Epíteto Específico</b>	Loess.
<b>Nombre Científico</b>	<i>Ilex guayusa</i> Loess <sup>7</sup>

---

<sup>6</sup> JORGENSEN, P. et al. (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador, pp. 225-227.

<sup>7</sup> CHANCARI A., Jorge. et al. (2007). Estudio sobre la taxonomía y estado de conservación de la guayusa (*Ilex guayusa* Loess) del Cantón Pastaza, pp. 4.

### **1.1.3. UBICACIÓN**

Las hojas de *Ilex guayusa* L., utilizadas pertenecen al Oriente ecuatoriano:

Provincia: Sucumbíos

Cantón: Lago Agrio

Parroquia: Nueva Loja

Latitud: 0.0870

Longitud: -76.9199

### **1.1.4. APLICACIONES**

En Ecuador el uso más común de la guayusa es en forma de té, usada como bebida refrescante y tonificante debido a su elevado contenido de xantinas de tipo cafeína. A la vez se le atribuyen propiedades hipoglucemiantes en pacientes diabéticos. El té se prepara agregando a un litro de agua hirviendo 4 o 5 hojas y se toma de una a dos tazas al día.<sup>8</sup>

La infusión de guayusa se lo utiliza como:

- Relajante nervioso y muscular.
- Se ha evidenciado que es un posible reductor de la glucosa.
- Estimulante digestivo.
- Efecto expectorante.<sup>8</sup>

### **1.1.5. COMPOSICIÓN**

Las hojas contienen cafeína como principal componente pero en cantidades variables, superiores a las del café y el té; contiene cantidades menores de teobromina y teofilina además de otros compuestos como:

- Aceites esenciales.
- Taninos.
- Esteroides.
- Alcaloides tipo xantinas (hasta un 1,31%).
- Saponinas.
- Flavonoides.
- Triterpenos.<sup>9</sup>

---

<sup>8</sup> CORREA, Q. (1989). Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andres Bello, pp. 44-51.

<sup>9</sup> IBIDEN (5). pp. 5-8.



## 1.2. CAFEÍNA

### 1.2.1. DEFINICIÓN

La cafeína está compuesta por 1, 3,7-trimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona cuya fórmula molecular es  $C_8H_{10}N_4O_2$  y con un peso molar molecular de 194, 2 g/mol.

Su consumo es general a nivel mundial procedente de una gran variedad de fuentes. Es considerada como una sustancia alcaloide perteneciente al grupo de las bases xánticas, que se caracterizan por tener poca basicidad, ser considerablemente solubles en agua en comparación con otros alcaloides y disolventes de tipo orgánico clorados.<sup>10</sup>

### 1.2.2. CARACTERÍSTICAS

En estado puro es un sólido cristalino dependiendo de la pureza y controles de extracción, presenta coloración blanca, sedosa y con sabor amargo. Es soluble en agua hirviendo pero poco soluble en etanol anhidro.

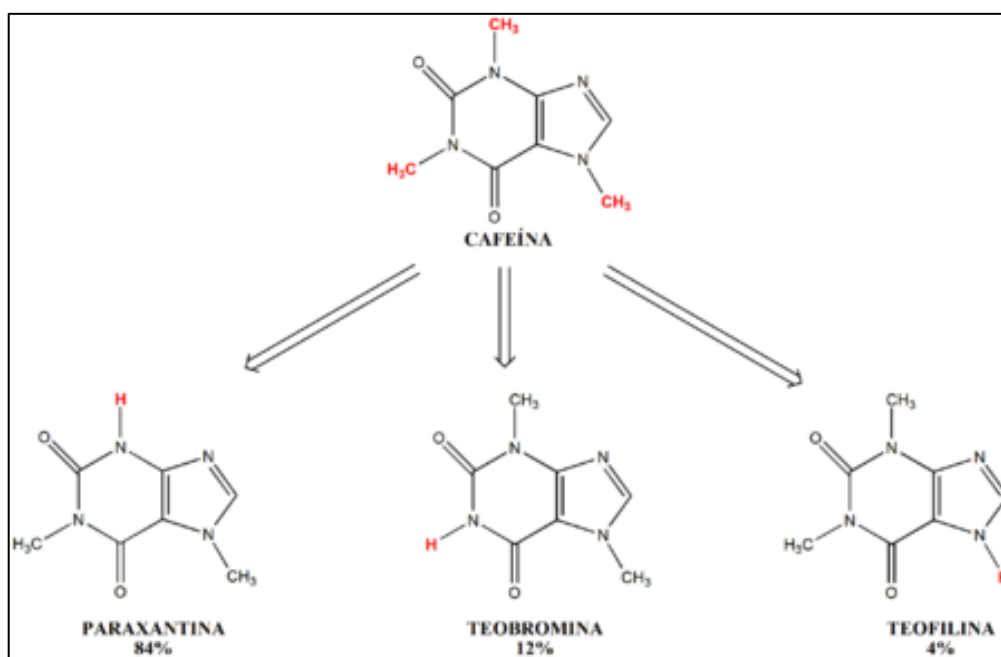


FIGURA 1. CAFEÍNA Y DERIVADOS.

<sup>10</sup> REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA. (2005). Coedición de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. (Norma), pp. 247-289.

### **1.2.3. APLICACIONES**

Es reconocido como un estimulante del estado de ánimo y la mejora cognitiva, brinda ayuda ergogénica para el rendimiento deportivo, de manera principal para deportes de resistencia, un consumo de 3 a 6 mg/ kg peso/día la cafeína disminuye el tiempo de recuperación del agotamiento, la promoción de una mayor capacidad de trabajo, y reducir el esfuerzo percibido por algún ejercicio físico o mental. Y en estudios actuales ha demostrado producir sinergia en combinación con analgésicos.<sup>11</sup>

La cafeína al ser una metilxantina actúa en el organismo como un inhibidor no selectivo de los receptores de adenosina A2a y A1 en el cerebro, demostrando el potencial de ser un fármaco neuroprotector.<sup>12</sup>

### **1.2.4. MECANISMO DE LA CAFEÍNA**

Las metilxantinas (cafeína, teofilina y teobromina) actúan como antagonistas competitivas de la adenosina, esto produce una inhibición de la fosfodiesterasa que da lugar a un incremento de las concentraciones de AMPc, de GMPc, una activación de canales de K<sup>+</sup> y una inhibición de los canales de calcio produciendo un efecto vigorizante.<sup>13</sup>

En el cerebro la adenosina inhiben la liberación de numerosos neurotransmisores (GABA, acetilcolina, dopamina, glutamato, noradrenalina y serotonina), la cafeína producirá el efecto contrario.<sup>13 14</sup>

El bloqueo de los receptores adenosínicos tiene una acción vasoconstrictora en los vasos cerebrales, lo que explica su funcionamiento coadyuvante en el tratamiento de cefaleas vasculares. Se requiere una dosis mínima de 40 - 60 mg de cafeína por vía oral para producir efecto analgésico.<sup>13</sup>

---

<sup>11</sup> BRITTANIE M. et al. (2013). An overview on caffeine, pp. 487- 495.

<sup>12</sup> BEHAV B. (2014). Caffeine neuroprotective effects on 6-OHDA-lesioned rats are mediated by several factors, including pro-inflammatory cytokines and histone deacetylase inhibitions, pp. 116-125.

<sup>13</sup> FLÓREZ, J. (2004). Farmacos y dolor, pp. 35-61.

<sup>14</sup> ORRÚ, M. et al. (2013). Psychostimulant pharmacological profile of paraxanthine, the main metabolite of caffeine in humans, pp 476- 484.

Los picos más altos de absorción de cafeína en sangre es durante los 30-75 minutos después de su ingesta; su consumo debe ser controlado, en lo que se refiere a la dosificación y el tiempo, basándonos en la tolerancia individual.<sup>15</sup>

Para garantizar el mejor efecto analgésico los usuarios no deben hacer uso habitual de la cafeína, de igual manera, si se desea un incremento máximo sobre el rendimiento físico se debe abstener de consumirla por lo menos 7 días antes de un evento deportivo.<sup>15</sup>

Este incremento de rendimiento físico se debe a que la cafeína estimula el consumo interno de las reservas de energía, por esa razón es considerada como adelgazante pero debe ir de la mano de actividad física para obtener mejores resultados y eliminar esos acúmulos de carbohidratos y grasa del cuerpo.<sup>15</sup>

### **1.3. FORMAS FARMACÉUTICAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA DE ADMINISTRACIÓN ORAL**

#### **1.3.1. DEFINICIÓN**

Son formas farmacéuticas que se obtiene por la aplicación de uno o varios procesos tecnológicos que se aplican sobre la sustancia química de interés para modificar su liberación o interacción con el medio en el cual será utilizado, con el objetivo de controlar el lugar o momento, la duración y la magnitud de su acción.<sup>16</sup> Aulton (1)

#### **1.3.2. CLASIFICACIÓN SEGÚN EL MECANISMO GENERAL DE ACCIÓN**

Las formas solidas de liberación modificada están destinadas a retardar el efecto terapéutico del principio activo, o a su vez, prolongar la acción del medicamento.

La liberación de estos fármacos en el tracto digestivo implica, integrar el activo determinado a una forma farmacéutica específica, que actúe como un dispositivo de control, brindar un perfil de cesión optima, se los pueden categorizar de la siguiente manera:

- Fármacos que liberan el principio activo durante un período de tiempo prolongado, tienen una cinética predecible, con el objetivo de alargar el lapso tiempo para obtener un nivel plasmático dentro de la zona terapéutica.
- Y sistemas diseñados para modificar la velocidad de tránsito del fármaco durante su transcurso por el tracto.<sup>16</sup>

---

<sup>15</sup> IBIDEN (11). pp. 487-495.

<sup>16</sup> AULTON, M. (2004). La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas, pp. 22-32.

### **1.3.3. CLASIFICACIÓN SEGÚN EL TIPO DE LIBERACIÓN**

La terminología utilizada para definir las formas farmacéuticas orales de liberación modificada es muy amplia, y para entenderlo más claro la dividimos.<sup>17</sup>

#### **1.3.3.1. FORMAS FARMACÉUTICAS DE LIBERACIÓN SOSTENIDA**

Estos fármacos liberan rápidamente la cantidad necesaria del principio activo para conseguir la respuesta farmacológica deseada y posteriormente, presenta una liberación constante de forma que la velocidad de absorción del principio activo sea igual a la velocidad de eliminación durante un tiempo prolongado.

Se trata normalmente de 10 a 24 horas, presentando una cinética de liberación orden cero, consiguiendo se mantenga constante a nivel plasmático.<sup>17</sup>

#### **1.3.3.2. FORMAS FARMACÉUTICAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA**

Presentan una liberación del fármaco lenta pero no constante, es decir con un pequeño exceso al mínimo necesario para ejercer el efecto terapéutico deseado, como ejemplo tenemos a comprimidos matriciales, de tipo hidrófilos o lipófilos.

#### **1.3.3.3. FORMAS FARMACÉUTICAS DE LIBERACIÓN REPETIDA**

Estas formas farmacéuticas liberan una dosis conocida del fármaco y tras un período de tiempo liberan otra dosis semejante, se puede repetir dos o más veces. Y entre estos intervalos no existe liberación de principio activo.

Un ejemplo de este método es la elaboración de gránulos o núcleos de una misma forma farmacéutica, pero que posean diferentes recubrimientos que modifiquen los puntos de disolución en base a los diferentes pH del canal gástrico intestinal para su liberación.<sup>17</sup>

#### **1.3.3.4. FORMAS FARMACÉUTICAS DE LIBERACIÓN RETARDADA**

Llamadas también de forma diferida, que se emplean para la liberación de principios activos en el tracto digestivo según el pH específico de la zona donde se desee obtener el efecto terapéutico.

Se aplica para comprimidos gastrorresistentes y en sistemas colónicos (liberación del principio activo en la primera porción del colon).<sup>17</sup>

---

<sup>17</sup> SUÑÉ, J. (2003). Nuevas aportaciones galénicas a las formas de administración, pp. 2-10.

Para mejorar la ilustración de los métodos descritos anteriormente, la siguiente figura representa los diferentes perfiles de concentración plasmática obtenidos a partir de distintos tipos de formas farmacéuticas orales de liberación modificada.<sup>18</sup>

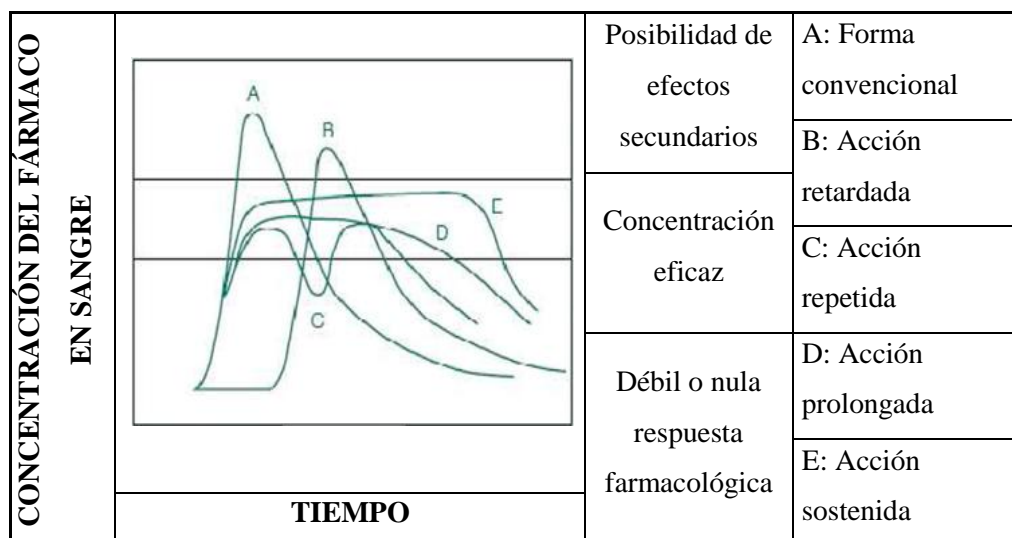


GRÁFICO 1. PERFILES DE CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE FÁRMACOS

## 1.4. MICROENCAPSULACIÓN

### 1.4.1. DEFINICIÓN

Se define como un proceso de recubrimiento de principios activos, bajo la forma de moléculas, partículas sólidas o líquidas con una amplia gama de materiales, para dar como resultado partículas a escala de tamaño micrométrico.<sup>19</sup>

El producto de este proceso recibe el nombre de micropartículas, microcápsulas o microesferas (Figura 2), tienen como característica común su tamaño el cual es siempre inferior a 1mm; si fuese menor a 1µm se los denomina nanopartícula o nano esfera. La diferencia radica en su morfología y estructura interna.<sup>20</sup>

<sup>18</sup> IBIDEN (17). pp. 2-10.

<sup>19</sup> LÓPEZ G., Gema. (2007). Diseño de formas farmacéuticas líquidas de liberación modificada para el tratamiento del dolor, pp. 143-153.

<sup>20</sup> LOPEZ C., Lya C.; VILLALTA H, Marvin A., (2009). Propuesta de un método para la elaboración de microesferas matriciales de ácido acetilsalicílico utilizando alginato de sodio por la técnica de gelificación iónica, pp. 29.

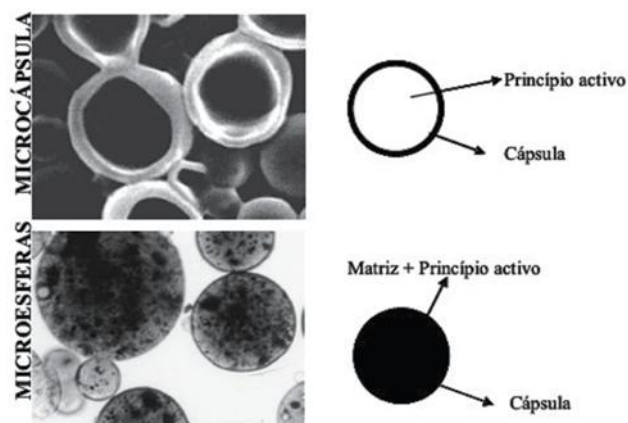


FIGURA 2. ILUSTRACIÓN DE MICROCÁPSULAS Y MICROESFERAS

#### 1.4.2. TIPO DE MICROCÁPSULAS

Para entender de mejor las definiremos de manera individual:

##### 1.4.2.1. MICROCÁPSULAS

Son partículas de forma esférica que se constituyen por un recubrimiento sólido y en su interior puede contener un activo sólido o líquido, formando un sistema heterogéneo.<sup>21</sup>

##### 1.4.2.2. MICROESFERAS

Están formadas por una red continua de material polimérico o de soporte, donde la sustancia de interés se encuentra dispersa en estado molecular (solución sólida) o al estado particular (dispersión sólida). Este tipo de encapsulación constituye un sistema homogéneo.<sup>21</sup>

##### 1.4.2.3. MICROCÁPSULAS HOMOGÉNEAS Y HETEROGÉNEAS

Son homogéneas en formas multinucleares y son heterogéneas si hablamos de dispersiones particulares. Es decir, son sistemas intermedios entre los dos estados de heterogeneidad (microcápsulas) y homogeneidad (microesferas).

Existen zonas marcadas con más principio activo y otras con poco, poseen una estructura interna en forma de dispersión cristalina.<sup>21</sup>

<sup>21</sup> MURILLO, O. et al. (2001). Liberación controlada de principios activos mediante el empleo de formulaciones galénicas, pp. 3-5.

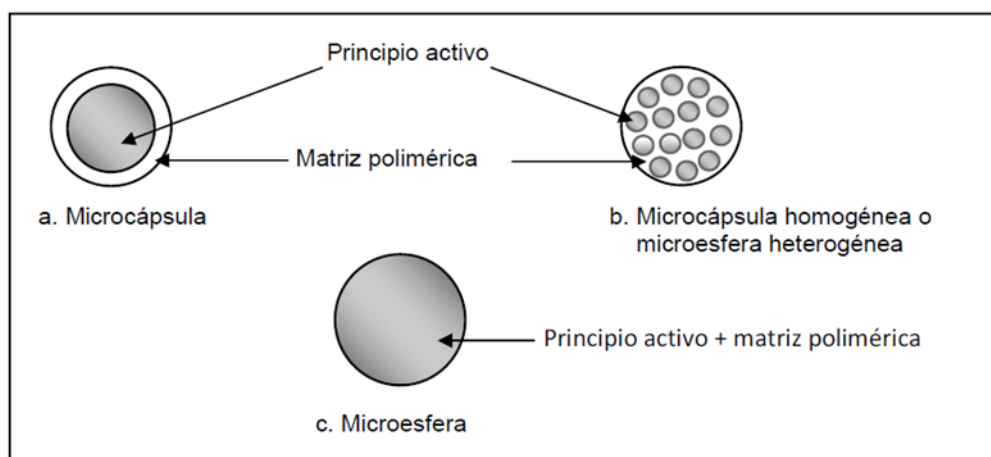


FIGURA 3. DIFERENCIAS ESTRUCTURALES ENTRE MICROCÁPSULAS, MICROESFERAS Y MICROCÁPSULA HOMOGÉNEA.

### 1.4.3. APLICACIÓN

Según las necesidades requeridas el técnico selecciona el método de microencapsulación para obtener partículas con una u otra estructura (Figura 4), el tipo más común son esferas con un solo núcleo.<sup>22</sup>

Las micropartículas poseen una amplia versatilidad ya que pueden administrarse bajo formas de suspensión; incluidas en cápsulas o en comprimidos, donde la vía de administración condiciona la forma farmacéutica a elección.

En la actualidad están destinadas a ser administradas por vía oral; existe un crecimiento tecnológico de microcápsulas administrables por vía parenteral.<sup>23</sup> López (27)

<sup>22</sup> IBIDEN (21). pp. 3-5.

<sup>23</sup> IBIDEN (19). pp. 143-153.

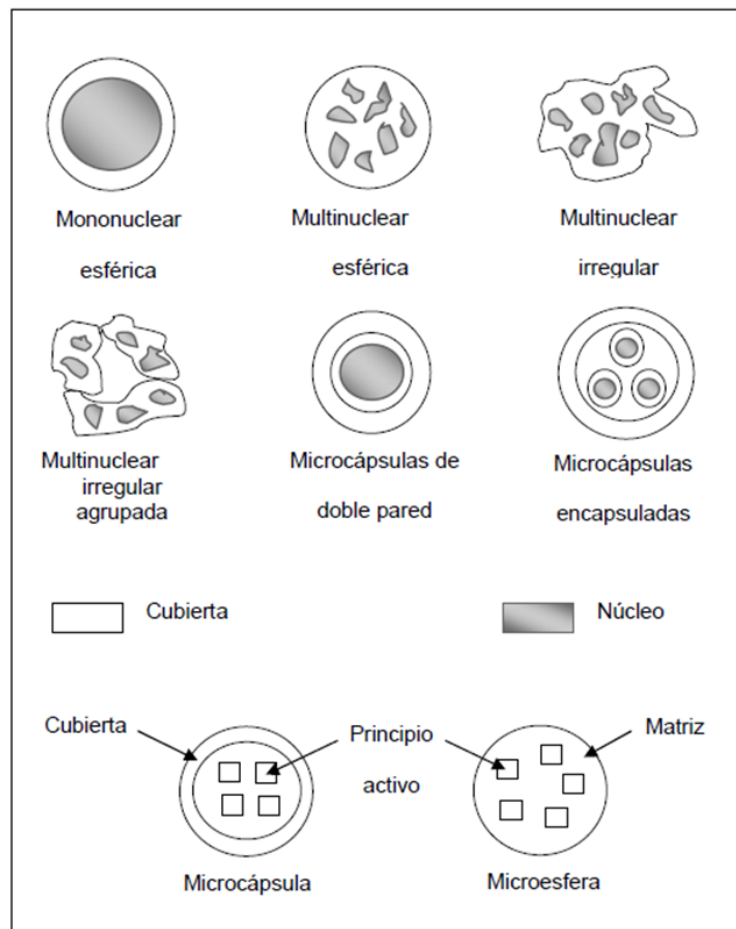


FIGURA 4. ESTRUCTURAS INTERNAS DE MICROCÁPSULAS Y MICROESFERAS

Las aplicaciones que sustentan la microencapsulación de fármacos son:

- Aseguran una protección del fármaco frente a los agentes externos que podrían aportar a su degradación. Como en el caso de las vitaminas A y K que son susceptibles a la degradación por ser fotosensibles.
- Para enmascarar características organolépticas no deseadas de ciertos principios activos, como en las tetraciclinas, cisteína y ampicilina.
- Modifica la solubilidad de un fármaco permitiendo la liberación del principio activo de manera localizada.
- Puede reducir el efecto irritante que causan algunos medicamentos, esto ocurre generalmente a nivel de mucosa gastrointestinal; un ejemplo clásico es el ácido acetilsalicílico de liberación controlada que en comparación con su versión convencional provoca menos daños.



- En el caso de medicamentos compuestos por dos o más principios activos se puede proteger la interacción si existiese incompatibilidad entre sí.
- La principal función en la actualidad es conseguir una liberación sostenida o controlada del principio activo.<sup>24</sup>

#### 1.4.4. MÉTODOS DE MICROENCAPSULACIÓN

Con el tiempo varían cada vez más los métodos de microencapsulación, debido a la aplicación de nuevos materiales y a requerimientos específicos que presentan algunos principios activos. A continuación describimos los principales métodos que desarrollan a nivel industrial.<sup>25</sup>

MÉTODO	MEDICAMENTO	TAMAÑO DE PARTÍCULA
Coacervación (Separación de fases)	Sólido - líquido	1 – 1000 $\mu\text{m}$
Polimerización interfacial	Sólido - líquido	1 – 1000 $\mu\text{m}$
Extracción/evaporación disolvente	Sólido - líquido	0,1 – 1000 $\mu\text{m}$
Atomización y atomización – congelación	Sólido - líquido	1 – 1000 $\mu\text{m}$
Suspensión en aire	Sólido	50 – 5000 $\mu\text{m}$
Gelificación iónica	Sólido	> 1000 $\mu\text{m}$

CUADRO 1. MÉTODOS DE MICROENCAPSULACIÓN

#### 1.5. GELIFICACIÓN IÓNICA

Esta técnica se basa en una cubierta formada por una reacción de gelificación de carácter iónico entre un polisacárido (polianión) y un ión de carga opuesta (catión).

<sup>24</sup> IBIDEN (20). pp. 29.

<sup>25</sup> VALDÉS L., Oscar. (2005). Diseño de soportes combinados a base de polímeros naturales y sintéticos para su evaluación en cultivos celulares y la liberación de principios activos, pp. 2-155.

Estas cubiertas son insolubles entre sí, pero poseen permeabilidad que hacen posible la liberación del activo. Por lo general, se recurre a compuestos algínicos con cloruro cálcico para la gelificación iónica.<sup>26</sup>

### **1.5.1. TIPOS DE GELIFICACIÓN IÓNICA**

Al momento existen dos métodos que son la gelificación externa y la gelificación interna.

#### **1.5.1.1. GELIFICACIÓN IÓNICA EXTERNA**

Generalmente se utilizan sales de calcio como fuente catiónica y compuestos algínicos como fuente polianiónica. La sustancia de interés a encapsular debe ser diluida previamente sobre una de estas soluciones tomando en cuenta su carga iónica para que no exista competencia al momento de formarse la cobertura del hidocoloide.

Es difícil controlar el tamaño de la partícula resultante, su tamaño entre 400µm y 1mm.<sup>24</sup>

La fuente de calcio más utilizada es el cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), debido a su mayor disponibilidad del calcio en solución (iónica); pero existen otras sales que podemos hacer uso, como el acetato monohidratado, el lactato de calcio y carbonato de calcio.<sup>24</sup>

#### **1.5.1.2. GELIFICACIÓN IÓNICA INTERNA**

Consiste en la liberación de ión calcio desde un complejo insoluble a una solución de alginato de sodio. Se lleva a cabo por acidificación de un sistema aceite-ácido soluble, estando el alginato (o carbonato de calcio) en fase acuosa.

Esta técnica permite obtener partículas de un tamaño aproximado de 50µm a 5µm.<sup>24</sup>

El ión calcio se libera de manera controlada desde una fuente interna de carácter insoluble o parcialmente soluble, donde el ión calcio se dispersa de dos formas:

- Si la sal de calcio es insoluble a pH neutro pero si soluble a pH ácido, se acidifica el medio con un ácido orgánico hasta la solubiliza los iones. Las sales de calcio pueden ser carbonato de calcio, fosfato tricálcico, fosfato dicálcico o el citrato tricálcico, y para la acidificación del medio podemos utilizar ácido acético, adípico o el glucono delta-lactona.

---

<sup>26</sup> HELGERUD, T. et al. (2010). In food stabilizers, thickeners and gelling agents, alginates, pp. 34-56.

Si es soluble, se adiciona a la mezcla de alginato-sal de calcio, un agente secuestrante como el fosfato, sulfato o citrato de sodio; estos compuestos retrasan el proceso de gelificación al enlazarse con el ion calcio libre.<sup>27</sup>

La diferencia entre la gelificación externa e interna radica en la cinética del proceso, es decir, en el control de la transición sol-gel. En la gelificación externa se maneja la concentración de calcio y el tipo de polímero, mientras que en la gelificación interna se considera la concentración de iones calcio y su solubilidad, así como el empleo de agentes secuestrantes y del ácido orgánico empleado.<sup>28</sup>

### **1.5.2. GELIFICACIÓN IÓNICA EXTERNA CON ALGINATO DE SODIO**

Se realiza la gelificación iónica externa con alginato de sodio preparando una solución acuosa del polímero en el que estará disuelto el principio activo a encapsular, esta solución se dispersa en forma de microgotas sobre una solución de cloruro de calcio la cual formara una red de cobertura emisible generando las microcápsulas que contienen en su interior el activo.<sup>28</sup>

Este nuevo gel llamado alginato cálcico posee una pared permeable que permite la salida de la fármaco, esta solubilidad será en su totalidad cuando los pesos moleculares de las sustancias encapsuladas sean menores a 5000 Dalton, una solubilidad media las que pasean hasta 10.000 Dalton, pero si se sobrepasa esta medida la difusión no ocurre.<sup>29</sup>

Por este método los compuestos lipídicos aunque posean el peso molecular requerido no podrán difundirse en el medio y permanecerán en la matriz.<sup>28</sup>

En la actualidad este método sirve para encapsular microorganismos, células, moléculas procedentes de alimentos y fármacos.

### **1.5.3. MECANISMOS DE GELIFICACIÓN IÓNICO CON ALGINATO**

Comienza a partir de una solución alginato de sodio y una solución de cloruro de calcio, donde el ión calcio se difunde hasta saturar la cadena polimérica, en esta unión se produce un reordenamiento estructural que da como resultado un gel.<sup>30</sup>

---

<sup>27</sup> IBIDEN (26). pp. 34-56.

<sup>28</sup> DRAGET, K. (2000). Handbook of hydrocolloids-alginates, pp. 1-19.

<sup>29</sup> YÁÑEZ, F. et al. (2005). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación, pp. 24-30.

<sup>30</sup> FUNAMI, T. et al. (2009). Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and calcio binding, pp. 1746-1755.

El entrecruzamiento iónico divalente sucede entre los iones de calcio y las moléculas de ácido gulurónico del alginato, en su forma espacial el llamado “modelo de caja de huevo” (Figura 5 ).<sup>31</sup>

Pero estequiométricamente se requiere del 7,2% de cloruro de calcio (basandonos en el peso del alginato de sodio) para una sustitución completa, esto significa que con el 2,2% de calcio se logra la gelificación. Ya formado el gel los iones se siguen difundiendo en el alginato, provocando que las microcapsulas se vaya endureciendo con el tiempo.<sup>32</sup>

El grado y rapidez de gelificación depende del pH, concentración de iones, concentración de alginato, etc.<sup>31</sup>

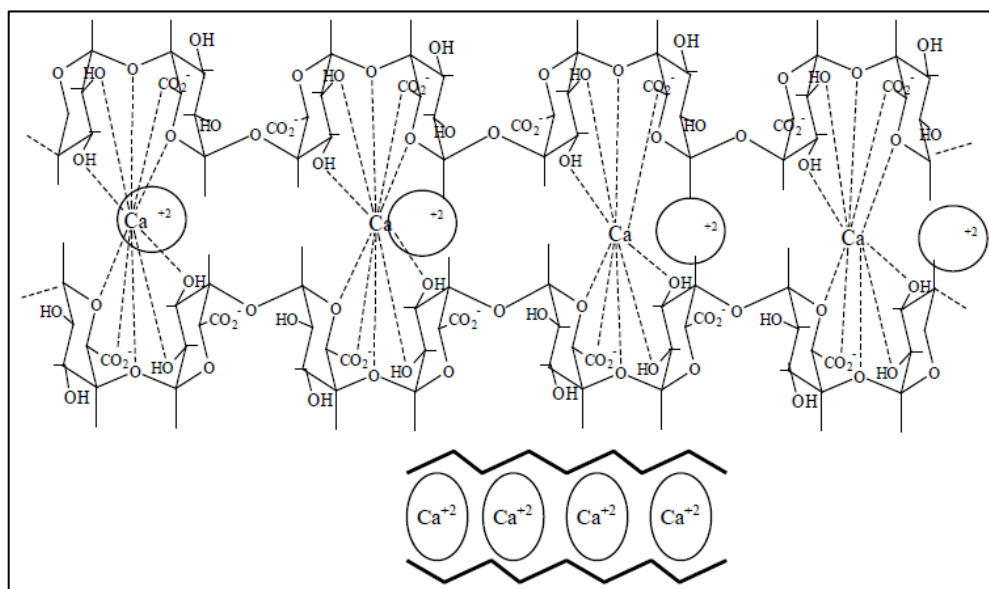


FIGURA 5. FORMACIÓN ALGINATO DE CALCIO.<sup>33</sup>

Los gránulos formados por alginato sodio tienen una alta biocompatibilidad, destacando el hecho de no ser tóxicos por vía oral.<sup>34</sup>

Otra ventaja es su incapacidad para difundirse en entornos ácidos, mientras que lo hace con facilidad en entornos básicos, convirtiéndose en un gastroprotector por naturaleza ante los jugos gástricos.<sup>35</sup>

<sup>31</sup> IBIDEN (28). pp. 1-19.

<sup>32</sup> PONCELET, D. et al. (1992). Production of alginate beads by emulsification/internal gelation, pp. 39-45.

<sup>33</sup> BELITZ, H. (1997). Química de los alimentos, pp. 150.

<sup>34</sup> PARK, P. et al. (1993). Biodegradable hydrogels for drug delivery, pp. 59-84.

## **CAPITULO II**

### **2. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **2.1. LUGAR DE REALIZACIÓN**

La presente investigación se desarrolló en los Laboratorios de Productos Naturales, Fitoquímica, Análisis Instrumental y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH

#### **2.2. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS**

##### **2.2.1. MATERIAL VEGETAL**

Fracción alcaloide de *Ilex guayusa* Loess.

##### **2.2.2. MATERIALES DE LABORATORIO**

- Balón aforado de 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml.
- Balón esmerilado de 500 ml, 1000 ml.
- Cápsulas de porcelana
- Embudo
- Embudo de separación de 100 ml
- Erlenmeyer de 250 ml, 1000 ml.
- Espátula
- Gradilla
- Jeringuilla 1 ml, 5 ml, 10 ml.
- Kitasato 250 ml, 500ml.
- Malla No. 6 y 14
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Pera de succión
- Piceta
- Pinza de cápsula
- Pinza de soporte universal
- Pinza de tubo de ensayo

---

<sup>35</sup> YOTSUYANAGI, T. et al. (1987). Calcium-Induced Gelation of Alginic Acid and Ph-Sensitive Reswelling of Dried Gels, pp.1555-1563.

- Pipetas graduadas de 1 ml, 5 ml, 10 ml.
- Placas cromatográficas de sílica gel 60 F<sub>254</sub>
- Probetas de 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml.
- Soporte universal
- Trípode
- Tubos de ensayo
- Varilla de agitación
- Vasos de precipitación de 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml.

### **2.2.3. EQUIPOS**

- Balanza analítica (Sartorius)
- Balanza de precisión
- Cámara UV
- Desecador
- Espectrofotómetro Ultravioleta (UV)
- Espectrofotómetro Infrarrojo (IR)
- Estufa (Ecocell)
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia (HPLC)
- Mufla (Furnace)
- Potenciómetro (Mettler Toledo)
- Refrigeradora
- Reverbero eléctrico
- Rotavapor
- Agitador magnético
- Aspersor
- Bomba de presión de aire

### **2.2.4. REACTIVOS**

- Acetato de etilo
- Acetona
- Ácido acético glacial
- Ácido clorhídrico
- Ácido fórmico
- Ácido sulfúrico

- Agua bidestilada
- Agua destilada
- Alginato de sodio
- Ciclo hexano
- Cloroformo
- Cloruro de calcio
- Dietilamina
- Etanol 96%
- Hidróxido de amonio
- Metanol absoluto
- Nitrito de sodio
- Reactivo de Dragendorff A
- Reactivo de Dragendorff B
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Wagner
- Tolueno

## **2.3. TÉCNICAS Y MÉTODOS**

### **2.3.1. CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA CRUDA**

El control de calidad contempla la revisión de parámetros definidos de la planta o parte de la planta con acción farmacológica, después que el material vegetal ha sido sometido a procesos de recolección y secamiento.<sup>36</sup> Se realizan las siguientes pruebas:

#### **2.3.1.1. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD**

Se pesó 2g la muestra pulverizada con una desviación permisible de 0.5 mg y se colocaron en una cápsula de porcelana previamente tarada y desecada a 105 °C, a partir de las 3 horas las muestras se pesan periódicamente hasta tener una masa constante.

El ensayo se realizó por triplicado.<sup>37</sup>

Cálculo:

$$\%H = \frac{m_2 - m_1}{m_2 - m} \times 100$$

---

<sup>36</sup> ITZIK, A. (2007). Las plantas curativas sanan desde siempre, pp. 230-240.

<sup>37</sup> INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. (1999). Control de calidad de productos naturales de uso medicinal, 21p.

Dónde:

H = Porcentaje de humedad (%).

m<sub>2</sub> = masa de la cápsula con la muestra (g).

m<sub>1</sub> = masa de la cápsula con la muestra desecada (g).

m = masa de la cápsula vacía.

100 = factor matemático.<sup>38</sup>

### **2.3.1.2. DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES**

La materia vegetal ya seca como resultado de la determinación del contenido de humedad, se calcinó en un reverbero hasta ausencia de humos. Después se incineró la muestra a una temperatura entre 500°C y 550°C aproximadamente por 2 horas, hasta tener cenizas de color blanco libres de residuos de carbono. Se enfrió la capsula de porcelana en el desecador y se pesa hasta masa constante. El ensayo se realizó por triplicado.

Cálculo:

$$\%C_T = \frac{m_2 - m_1}{m_2 - m} \times 100$$

Dónde:

%C<sub>T</sub>: porcentaje de cenizas totales (%).

m<sub>2</sub>: masa de la cápsula con la muestra incinerada (g).

m<sub>1</sub>: masa de la cápsula con la muestra antes de la incineración (g).

m: masa de la cápsula vacía (g).

100: factor matemático.<sup>38</sup>

### **2.3.1.3. DETERMINACIÓN DE CENIZAS SOLUBLES**

Las cenizas totales se les añadieron de 15 a 20 ml de agua, se cubrió y calentó suavemente en el reverbero durante 5 min. El contenido insoluble se recogió en un papel filtro, el residuo se transfirió a la capsula de porcelana; la muestra se carbonizó en el reverbero y luego se incineró en la mufla a una temperatura de 500-550°C, durante dos horas. Luego, se enfría en el desecador hasta temperatura ambiente y se pesa. Se repitió el procedimiento hasta obtener un peso constante.<sup>38</sup>

Cálculo:

$$\%C_S = \frac{m_2 - m_1}{m_2 - m} \times 100$$

---

<sup>38</sup> IBIDEN (37). 21p.



Dónde:

%C<sub>S</sub>: porcentaje de cenizas solubles en agua (%).

m<sub>2</sub>: masa de la cápsula con la muestra de cenizas totales (g).

m<sub>1</sub>: masa de la cápsula con la muestra de cenizas insolubles en agua (g).

m: masa de la cápsula vacía (g).

100: factor matemático.<sup>39</sup>

#### **2.3.1.4. DETERMINACIÓN DE CENIZAS INSOLUBLES**

Se realiza el análisis con ácido clorhídrico, donde, a las cenizas totales se le añadieron de 15 a 20 ml de ácido clorhídrico al 10%, se calentó en el reverbero durante 5 min. Posteriormente la solución se filtró a través de papel filtro y se lavó el residuo con agua caliente hasta que diera negativa la prueba con AgNO<sub>3</sub> 0.1 N. El residuo se transfirió a la cápsula inicial, se carbonizó en un reverbero y luego se incineró en la mufla entre 500°C y 550°C, durante 2 h; luego se enfrió en el desecador y se pesó hasta obtener una masa constante.

Cálculo:

$$\%C_I = \frac{m_2 - m_1}{m_2 - m} \times 100$$

Dónde:

%C<sub>I</sub>: porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico (%).

m<sub>2</sub>: masa de la cápsula con la muestra de cenizas totales (g).

m<sub>1</sub>: masa de la cápsula con la muestra de cenizas insolubles en ácido clorhídrico (g).

m: masa de la cápsula vacía (g).

100: factor matemático.<sup>39</sup>

#### **2.3.2. EXTRACCIÓN DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE *Ilex guayusa* L.**

La droga vegetal lavada, secada, molida a malla número 4 y aprobado el control de calidad, se procedió a la extracción de alcaloides por los dos métodos más utilizados y se identificó el más rentable.

---

<sup>39</sup> IBIDEN (37). 21p.

### **2.3.2.1. PERCOLACIÓN**

Se pesó 25 gramos de materia vegetal y lo humedecimos con alcohol potable al 96% hasta cubrir todo el vegetal dejándola en reposo durante 40 minutos. Posteriormente se colocó en un percolador ámbar, homogenizando la muestra por todo el recipiente sin dejar vacíos.

La percolación se la realizo con alcohol potable al 96% a una velocidad de extracción de 20 gotas kilogramo muestra por minuto hasta agotamiento.

Todas las trazas de extracción alcohólica se juntaron y se concentraron a un litro por rotavapor a 60°C, 70 rpm y una presión de -0,4 Atm. Luego, se procedió a desclorofilar el extracto con ciclo hexano. El extracto libre de clorofila se colocó en el rotavapor en las mismas condiciones anteriores para eliminar residuos del ciclo hexano y concentrar la muestra. Posteriormente, se acidifico el extracto con una solución de ácido sulfúrico al 1% hasta obtener un pH 3. Se dejó reposar por una hora y luego se extrajo el alcohol por medio del rotavapor en las mismas condiciones anteriores.<sup>40</sup>

La solución sin alcohol se alcalinizo con hidróxido de amonio al 5% hasta obtener un pH básico de 8,5. En un embudo de separación se lavó la solución con varias trazas de cloroformo para extraer los alcaloides. En un balón esmerilado previamente tarado se colocó la fracción orgánica que fue puesta en el rotavapor para extraer el cloroformo a 60°C a 50rpm y presión de -0,4 Atm. Los alcaloides resultantes se cuantificaron por gravimetría.<sup>40</sup>

### **2.3.2.2. DIGESTIÓN ÁCIDA**

Se pesó 25gramos de materia vegetal, se humedeció con ácido sulfúrico al 2 % hasta cubrir todo el vegetal. Se realizó la digestión acida en el rotavapor por 30 minutos a una temperatura de 60°C y 50 rpm; posteriormente se procedió a filtrar para extraer la parte orgánica más gruesa y luego a filtrar al vacío para eliminar el resto de impurezas.<sup>40</sup>

Se dejó reposar en refrigeración por 24 horas y se procedió nuevamente a filtrar el resto de partículas que precipitaron. Todas las trazas de la solución ácida se concentraron a un litro por rotavapor a 70°C, 70 rpm y una presión de -0,4 Atm.

---

<sup>40</sup> SHARAPIN, N. et al. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos, pp. 63-81.

Se procedió a desclorofilar con ciclo hexano, el extracto libre de clorofila se colocó en el rotavapor en las mismas condiciones anteriores para eliminar residuos o trazas del ciclo hexano y concentrar la muestra.

La solución sin alcohol se alcalinizo con hidróxido de amonio al 5% hasta obtener un pH básico de 8,5. En un embudo de separación se lavó la solución con varias trazas de cloroformo para extraer los alcaloides. En un balón esmerilado previamente tarado se colocó la fracción orgánica que fue puesta en el rotavapor para extraer el cloroformo a 60°C a 50rpm y presión de -0,4 Atm. Los alcaloides resultantes se cuantificaron por gravimetría.<sup>41</sup>

### **2.3.3. CONTROL DE CALIDAD DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA**

#### **2.3.3.1. DESCRIPCIÓN ORGANOLÉPTICA DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA**

Se tomó una alícuota de 20 ml que contenía 40 mg/ml de alcaloides totales y se colocó en un vaso de precipitación de 50 ml. El análisis sensorial fue el siguiente:

Aspecto: Se observó contra luz la presencia de partículas y/o turbidez.

Color: Se determinó por observación directa.

Olor: Característico a la planta.

#### **2.3.3.2. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS**

##### **2.3.3.2.1. DETERMINACIÓN DE pH**

Se midió directamente con el equipo potenciométrico previamente calibrado, una alícuota de 20 ml.

##### **2.3.3.2.2. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN.**

Se procedió a medir la muestra directamente en el refractómetro.<sup>42</sup>

Cálculo:

$$n_d^{25} = n_d^t + 0,00044 \quad T - 25$$

---

<sup>41</sup> IBIDEN (40). pp. 63-81.

<sup>42</sup> MIRANDA, M. et al. (2000). Evaluación farmacognóstica y fitoquímica preliminar de *hyllanthus r bicularis* HBK, pp. 56-62.

Dónde:

$n_d^{25}$ : Índice de refracción corregido a 25°C.

$n_d^t$ : Índice de refracción determinado.

0.00044: factor de corrección matemático.

25: factor de corrección matemático.

T: temperatura de realización del análisis.

### **2.3.3.2.3. TAMIZAJE FITOQUÍMICO**

#### **a) ENSAYO DE DRAGENDORFF**

Permite identificar la presencia de alcaloides de manera cualitativa, para lo cual, a la muestra concentrada libre de solventes se añade 1 ml de ácido clorhídrico al 1 % en agua, luego se calienta suavemente y se deja enfriar hasta acidez. Posteriormente, añadimos 3 gotas del reactivo de Dragendorff A y después gota a gota de reactivo Dragendorff B si existe opalescencia se considera (+) turbidez definida (++), precipitado (+++).<sup>43</sup>

#### **b) ENSAYO DE MAYER**

Partimos de la muestra ácida, luego añadimos de 2 a 3 gotas de la solución reactiva de Mayer, si hay opalescencia se considera (+) turbidez definida (++), precipitado coposo (+++).<sup>43</sup>

#### **c) ENSAYO DE WAGNER**

Partimos de la solución ácida, y posteriormente añadimos de 2 a 3 gotas del reactivo de Wagner, clasificamos los resultados del ensayo de la misma forma.<sup>43</sup>

#### **d) ENSAYO DE XANTINAS**

Se toman 2 ml de la solución saturada de alcaloides, entonces añadimos 0,05 ml de disolución yodada de yoduro de potasio, la solución debe permanecer límpida. Añadimos 0,1 ml de ácido clorhídrico diluido, con lo cual se forma un precipitado pardo que se disuelve después de neutralizar con una disolución de hidróxido de sodio.<sup>44</sup>

---

<sup>43</sup> IBIDEN (43). pp. 56-62.

<sup>44</sup> IBIDEN (10). pp. 247-289.

### 2.3.3.3. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO EN CAPA FINA (TLC) DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA

- Partimos de una solución de 20 mg/ml de alcaloides totales en metanol.
- Aplicamos 10µl de la solución con ayuda de un capilar en una placa cromatográfica de sílica gel 60 F<sub>254</sub>.
- Dejamos secar después de cada aplicación
- Introducimos la placa en una cuba cromatográfica, hasta que el solvente recorra las ¾ partes de la placa.
- Retiramos la placa y dejamos secar para luego observar en la lámpara UV 365nm
- Revelar la placa y anotar los R<sub>f</sub>.

Adsorbentes: Sílica gel 60 F<sub>254</sub>

Sistema de solventes: tolueno - acetato de etilo – dietilamina (70:20:10).<sup>45</sup>

Revelado: Dragendorff spray reagent (1ml de reactivo de Dragendorff (A+B), 2ml de ácido acético glacial y 10 ml de agua).

Para mejorar la definición de las manchas cromatográficas se revelo con una segunda solución al 10 % de nitrito de sodio.<sup>45</sup>

Cálculo:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida de la muestra}}{\text{Distancia recorrida del solvente}}$$

### 2.3.3.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC) DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA

Es una técnica de medición que utiliza una fase móvil líquida específica para la separación de macromoléculas de interés biológico y de compuestos iónicos con una alta sensibilidad de detección.<sup>46</sup>

Procedimiento:

Fase móvil: metanol – agua (30:70)

Agua bidestilada

Marcador estándar: Cafeína Bayer

---

<sup>45</sup> WAGNER, H. et al. (2001). Plant drug análisis, athing layer chromatography, pp. 24-34, 361.

<sup>46</sup> SKOOG, D. et al. (2001). Principios de análisis instrumental, pp. 785-790.

- a) Preparación de los patrones de cafeína
- Pesar 0,025g de estándar de cafeína
  - Transferimos a un balón de 50 ml y aforar con metanol – agua (30:70)
  - Tomar 0,50 ml de esta solución
  - Transferir a un balón de 50 ml y aforar con metanol – agua (30:70)
- b) Preparación de la muestra problema
- Pesar 0,025 g de la fracción alcaloidea
  - Transferimos a un balón de 50 ml y aforar con metanol – agua (30:70)
  - Tomamos 0,5 ml de la solución anterior
  - Transferir a un balón de 50 ml y aforar con metanol – agua (30:70)
- c) Análisis de las muestras
- Filtradas las soluciones se inyectaron tanto el estándar como la muestra problema en el equipo HPLC Shimadzu LC-10 Ai a 254 nm.
  - Obtención del tiempo de retención y el área bajo la curva cromatográfica de las muestras para la cuantificación.
  - Se extrapoló la altura del pico correspondiente de muestra problema con la curva estándar y se determinó la concentración de la muestra inyectada.

#### **2.3.3.5. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO ULTRAINVISIBLE (UV) DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA**

Este análisis nos permite determinar la concentración de un compuesto en base a la absorbancia de las radiaciones electromagnéticas a una determinada longitud de onda.<sup>47</sup>

Procedimiento:

Se tomó la fracción alcaloidea concentrada como patrón.

Para la curva de calibración se realizaron diluciones de 1ppm, 5ppm, 10ppm, 20ppm, 40ppm, 60ppm, 80ppm, y 100ppm.

Las muestras fueron filtradas por una membrana de 45 µm antes de ser leídas.

---

<sup>47</sup> IBIDEN (10). pp. 247-289.

Se realizó un barrido inteligente con el espectrofotómetro UV –Heyios Thermo Electron Corporation para determinar la longitud de onda de mejor absorbancia.

La lectura de las muestras se realizó a 273 nm. Como blanco agua destilada.

#### **2.3.4. ELABORACIÓN DE MICROCÁPSULAS POR GELIFICACIÓN IÓNICA EXTERNA**

##### **2.3.4.1. SOLUCIÓN DE ALGINATO DE SODIO**

Se prepararon cinco soluciones a concentraciones del 1%, 1,4%, 1,8%, 2% y 2,5% p/v.

- Se pesaron 1g, 1,4 g, 1,8 g, 2g y 2,5g de alginato de sodio respectivamente y se añadieron 100ml de agua destilada.
- Calentamos la solución de alginato de sodio a una temperatura de 50 °C por 5 min.
- Procedemos a mezclar de mejor manera a 750 rpm con el agitador magnético por 10 min.
- Una vez disuelto todo el alginato de sodio filtramos por medio de una bomba de vacío para eliminar impurezas.

##### **2.3.4.2. SOLUCIÓN DE CLORURO DE CALCIO**

Se prepararon cinco soluciones de cloruro de calcio al 3%.

- Se pesaron 3g de cloruro de calcio y se añadieron a 100ml de agua destilada, repitiendo el proceso cinco veces.
- Procedemos a mezclar la solución a 250 rpm con ayuda del agitador magnético por 10 min.
- Una vez disuelto todo el cloruro de calcio filtramos al vacío para eliminar posibles impurezas.<sup>48</sup>

##### **2.3.4.3. MICROCÁPSULAS DE ALGINATO DE CALCIO**

- La solución de cloruro de calcio ponemos en agitación magnética a 50 rpm.
- Con una jeringuilla de 10 ml tomamos la solución de alginato de sodio, y vertemos la solución por micro goteo con una aguja de 30G sobre el cloruro de calcio.

---

<sup>48</sup> OBIDIKEA, I. et al. (2011). Microencapsulation enhances the anti-ulcerogenic properties of Entada africana leaf extract, pp. 553-561.

- Se observa inmediatamente la formación de microcápsulas de alginato de calcio; una vez vertida toda la solución esperamos una hora para permitir el endurecimiento de las cápsulas.
- Realizamos una filtración y posteriormente las lavamos con una solución fría de alcohol-agua (50:50) para romper la carga iónica y obtener una mejor definición.
- Secamos el exceso de líquido por paso de flujo laminar de aire con ayuda de una bomba al vacío.
- A continuación las colocamos en la estufa de secado a 40°C hasta peso constante, y calculamos el rendimiento.<sup>49</sup>

#### **2.3.4.4. MICROENCAPSULACIÓN DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE *Ilex guayusa* L.**

Al terminar el ensayo anterior tomamos las dos soluciones con el mejor rendimiento de microencapsulación, y como las cápsulas de gelatina tienen una capacidad aproximada de contenido de 400 mg, realizamos los cálculos pertinentes para que por cápsula este presente 40 mg de alcaloides

- Preparamos la solución de cloruro de calcio como ya describimos anteriormente.
- La solución de alginato de sodio también lo preparamos de igual manera, y al tenerla disuelta y límpida, proseguimos añadiendo los alcaloides totales mezclándolos a 500 rpm por 10 min.
- Para la microencapsulación seguimos los mismos pasos ya mencionados tomando en cuenta que ya tendrán en su interior la fracción alcaloidea.

#### **2.3.5. CARACTERIZACIÓN DE MICROCÁPSULAS**

##### **2.3.5.1. HUMEDAD**

Se pesó 2g de microcápsulas con una desviación permisible de 0.5 mg y se colocaron en una cápsula de porcelana previamente tarada y desecada a 105 °C, a partir de las 4 horas las muestras se pesan periódicamente hasta tener una masa constante.

El ensayo se realizó por triplicado.<sup>49</sup>

Cálculo:

$$\%H = \frac{m_2 - m_1}{m_2 - m} \times 100$$

---

<sup>49</sup> IBIDEN (48). pp. 553-561.



Dónde:

H = Porcentaje de humedad (%).

m<sub>2</sub> = masa de la cápsula con la muestra (g).

m<sub>1</sub> = masa de la cápsula con la muestra desecada (g).

m = masa de la cápsula vacía.

100 = factor matemático.

#### **2.3.5.2. ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA Y MORFOLOGÍA**

Las microcápsulas obtenidas fueron analizadas por microscopía óptica, con un microscopio Olympus CX31 con un aumento de 40x.

#### **2.3.5.3. RENDIMIENTO DE PRODUCCIÓN**

Nos permite identificar el porcentaje de microcápsulas obtenidas por este proceso:

Cálculo:

$$\%R = \frac{\text{Cantidad de microcápsulas obtenidas}}{\text{Cantidad de microcapsulas esperadas}} \times 100$$

#### **2.3.5.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PRINCIPIO ACTIVO**

Se tomó 300 mg de microcápsulas, se pulverizaron para liberar los alcaloides y luego se diluyeron a 100.0 ml de agua sometiénolo a constante agitación. Se tomó una alícuota de 1 ml y se aforo a 10 ml de agua; la muestra se filtró una membrana de 0,45 µm, y se leyó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 273 nm (Espectrofotómetro UV–Heyios Thermo Electron Corporation).

#### **2.3.5.5. EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN**

Permite determinar la capacidad de microencapsulación del principio activo.

Cálculo

$$\%Ef = \frac{\text{Cantidad de principio activo encapsulado}}{\text{Cantidad teórica de principio activo}} \times 100$$

#### **2.3.5.6. ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA**

Nos permite determinar la presencia de grupos funcionales específicos de cada compuesto en función de la transmitancia que tienen las moléculas al ser expuestas a una emisión de radiación.<sup>50</sup>

---

<sup>50</sup> IBIDEN (10). pp. 247-289.

Procedimiento:

Se realizaron diluciones a 40 ppm de:

- La fracción alcaloidea.
- De las microcápsulas de alginato de calcio sin principio activo.
- Y de las microcápsulas que contienen alcaloides totales.

La lectura se realizó en un espectrofotómetro Infrarrojo Jasco FT/IR-4100

### **2.3.6. ELABORACIÓN DE LA FORMA DE DOSIFICACIÓN SÓLIDA**

Se elaboraron en el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica – ESPOCH y se utilizó una encapsuladora manual con capacidad de producción de 100 capsulas por lote.

Se emplearon capsulas blandas de gelatina, con un peso individual de 78 mg y capacidad de encapsulación de 400mg.

### **2.3.7. CONTROL DE CALIDAD DE FORMA DE DOSIFICACIÓN SOLIDA**

#### **2.3.7.1. UNIFORMIDAD DE CONTENIDO**

Se realizaron correcciones según el porcentaje de eficacia de encapsulación para contener 40 mg de alcaloides totales de *Ilex guayusa* L., en 400 mg de microcápsulas.

Para esto las microcápsulas de los lotes 4 y 5 deben contener 100 mg de la fracción alcaloidea en 1 g de microcápsulas.

- Se tomó 250 mg de microcápsulas, se pulverizaron para liberar los alcaloides y luego se diluyeron a 100.0 ml de agua sometiénolo a constante agitación.
- Se tomó una alícuota de 1 ml y se aforo a 10 ml de agua; la muestra se filtró con una membrana de 0,45 µm, y se leyó bajo el espectrofotómetro a una longitud de onda de 273 nm (Espectrofotómetro UV–Heyios Thermo Electron Corporation).

#### **2.3.7.2. UNIFORMIDAD DE MASA**

Nos permite comprobar si existe la misma cantidad de masa de las microcápsulas en el interior de cada cápsula, para esto se tomaron 10 capsulas por lote.

- Pesar individualmente 10 unidades.
- La masa individual de como máximo 1 de las 10 unidades puede desviarse de la masa media en un porcentaje más elevado que 7,5 %.
- Pero ninguna unidad puede desviarse en más del doble de este porcentaje.<sup>51</sup>

---

<sup>51</sup> IBIDEN (10). pp. 247-289.

Dónde:

$$\text{Promedio} = X_{\text{med}} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

N= número de datos

X= valores de interés

### **2.3.7.3. ENSAYO DE DISOLUCIÓN**

Para analizar el comportamiento de las microcápsulas de alginato de calcio se realizó el ensayo de disolución a pH 2,0 simulando fluidos gástricos y pH 7,4 simulando fluidos intestinales por separado y posteriormente un tercer ensayo continuo de pH 2,0 a pH 7,4.<sup>52</sup>

#### **2.3.7.3.1. ENSAYO DE DISOLUCIÓN EN pH 2,0**

a) Solución tampón pH 2,0

Disolver 6,57 g de cloruro de potasio en agua, añadir 119,0 ml de ácido clorhídrico 0,1M y diluir hasta 1000,0 ml con agua. Regulando el pH deseado. Farmacopea (14)

b) Ensayo

La disolución se realizó a  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  en 900 ml de solución tampón pH  $2 \pm 0.05$ . Las microcápsulas encapsuladas fueron colocadas en el aparato de cestillos, rotadas a una velocidad de 50 rpm, se tomaron muestras de 10 ml a diferentes períodos de tiempo con volumen de reposición en cada toma, se determinó el contenido disuelto por absorbancia UV a una longitud de onda de 273  $\mu\text{m}$ . Tomando una muestra de cada uno de los recipientes del disolutor marca Vankel 6010.

#### **2.3.7.3.2. ENSAYO DE DISOLUCIÓN EN PH 7,4**

a) Solución tampón de fosfato pH 7,4

A 393,4 ml de hidróxido de sodio 0,1 M se añadió 250,0 ml de disolución de dihidrogenofosfato de potasio 0,2 M; posteriormente se diluyó hasta 1000,0 ml con agua. Regulando el pH deseado.<sup>53</sup>

---

<sup>52</sup> WONG, Y. et al. (2011). Degradation of PEG and non-PEG alginate-chitosan microcapsules in different pH environments, pp. 2189-2197.

<sup>53</sup> IBIDEN (10). pp. 247-289.

b) Ensayo

La disolución se realizó a  $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  en 900 ml de solución tampón pH 7,4  $\pm 0,05$ . Las microcápsulas encapsuladas fueron colocadas en el aparato de cestillos, rotadas a una velocidad de 50 rpm, se tomaron muestras de 10 ml a diferentes períodos de tiempo con volumen de reposición en cada toma, se determinó el contenido disuelto por absorbancia UV a una longitud de onda de 273  $\mu\text{m}$ . Tomando una muestra de cada uno de los recipientes del disolutor marca Vankel 6010.

**2.3.7.3.3. ENSAYO DE DISOLUCIÓN CONTINUA pH 2,0 – pH 7,4**

a) Soluciones tampón.

Se utilizó la misma solución tampón pH 2,0 y la solución tampón de fosfato pH 7,4 para el ensayo.

b) Ensayo

La primera fase de disolución se realizó a  $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  en 900 ml de solución tampón pH 2,0  $\pm 0,05$ . Las microcápsulas encapsuladas fueron colocadas en el aparato de cestillos, rotadas a una velocidad de 50 rpm, se tomaron muestras de 10 ml a diferentes períodos de tiempo hasta alcanzar los 30 minutos, con volumen de reposición en cada toma.

En la segunda fase del ensayo tomamos el equipo de cestillos del disolutor con las microcápsulas residuales de la fase anterior y las colocamos en la solución tampón pH 7,4 continuando el ensayo continuando con las mismas especificaciones técnicas.

Se determinó el contenido disuelto por absorbancia UV a una longitud de onda de 273  $\mu\text{m}$ . Tomando una muestra de cada uno de los recipientes del disolutor marca Vankel 6010.

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 3.1. CONTROL DE CALIDAD DE LA ESPECIE VEGETAL

Se realizó el control de calidad de la planta *Ilex guayusa* Loess ya seca y pulverizada, las pruebas se realizaron por triplicado, obteniendo los siguientes resultados:

CUADRO 2. RESULTADOS DEL CONTROL DE CALIDAD DE *Ilex guayusa* L., DE LA DROGA SECA Y PULVERIZADA. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH-RIOBAMBA. ENERO DEL 2014.

ESPECIE VEGETAL	PRUEBAS							
	Contenido de		Cenizas				Cenizas Solubles	
	Humedad		Cenizas Totales		Insolubles en		en Agua	
					HCL			
	Esp.(%)	H (%)	Esp. (%)	C <sub>T</sub> (%)	Esp. (%)	C <sub>I</sub> (%)	Esp.(%)	C <sub>S</sub> (%)
<i>Ilex guayusa</i>	10	7,53	10	6,4891	2	1,1897	7	4,9812

Se obtuvo una humedad de 7.5% para las hojas de *Ilex guayusa* L., cuyo valor está dentro de las especificaciones de la Norma Ecuatoriana de Fitoterápicos que deben ser menores al 10%, estos valores bajos son de utilidad ya que nos permite interrumpir los procesos enzimáticos, sean estos a nivel celular del propio vegetal o de posibles microorganismos, impidiendo la pérdida potencial del principio activo.

Tenemos un valor de cenizas totales del 6,5%, que se encuentra dentro del rango de la norma sirviéndonos para identificar el contenido de minerales del vegetal.

El contenido de cenizas insolubles en ácido clorhídrico es de 1,2% y de cenizas solubles en agua del 4,9%, valores que se encuentran bajo el rango de referencia, que nos sirve para demostrar que la muestra no está contaminada con arena u otros minerales.

### 3.2. CONTROL DE CALIDAD DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA

De acuerdo a los análisis organolépticos y físico-químicos a partir de los métodos de extracción de percolación y digestión ácida se obtuvieron los siguientes resultados:

CUADRO 3. RESULTADOS DE LA DESCRIPCIÓN ORGANOLÉPTICA, PARÁMETROS FÍSICOS Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE LA *Ilex guayusa* L. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH-RIOBAMBA. ENERO DEL 2014.

COMPONENTES ANALIZADOS		Alcaloides totales de <i>Ilex guayusa</i> L.	
METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN		Percolación	Digestión Ácida
RENDIMIENTO		3,30%	2,19%
CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS	Color	Amarillo intenso	Amarillo
	Olor	Aroma característico	Aroma característico
	Aspecto	Uniforme	Uniforme
PARÁMETROS FÍSICOS	pH	7,3	6,5
	Índice de refracción	1,4	1,38
	Dragendorff	+	+
TAMIZAJE FITOQUÍMICO PARA ALCALOIDES	Mayer	+	+
	Wagner	+	+
	Ensayo de Xantinas (cafeína)	+++	+++

**VALORACIÓN CUALITATIVA DEL EXTRACTO:** (-) negativo, (+) baja evidencia, (++) evidencia, (+++) alta evidencia.

Los análisis del Cuadro 3, se realizaron para evaluar la calidad de los alcaloides contenidos, demostrando que pueden ser tomados como materia prima para la

conformación de los principios activos en la elaboración de fitofármacos, porque están dentro de los límites establecidos por la Real Farmacopea Española 2005, garantizando evitar problemas posteriores en la formulación final.

### 3.3. IDENTIFICACIÓN DEL MARCADOR QUÍMICO

Como marcador químico tomamos la cafeína ya que es el alcaloide con más alto porcentaje de presencia en la *Ilex guayusa* L., para lo cual realizamos los siguientes análisis de identificación y cuantificación:

#### 3.3.1. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO EN CAPA FINA (TLC) DE CAFEÍNA

La cromatografía de la cafeína y la cafeína extraída se realizó en placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub>, con un sistema de solventes específico para alcaloides.



FOTOGRAFÍA 1. CROMATOGRAFÍAS EN CAPA FINA DE ALCALOIDES TOTALES *Ilex guayusa* L.

En placas de Sílica gel 60 F<sub>254</sub>; sistema de solventes: Tolueno-Acetato de etilo-Dietilamina (70:20:10); Revelador 1. Spray Dragendorff; Revelador 2. Nitrito de sodio al 10%.

(a) **cafeína estándar.**

(b) **alcaloides totales extraídos por percolación.**

En la fotografía se observa la presencia de zonas color café que son pertenecientes a la cafeína presente de las fracciones alcaloides, con un R<sub>f</sub> 0.57 tanto el estándar como las muestras. En la fracción alcaloidea existe presencia de xantinas que por su semejanza son representadas por una sola mancha cromatográfica.

### 3.3.2. CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC) DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA

En el equipo HPLC Shimadzu LC-10 Ai, se pasaron las muestras de cafeína estándar y de alcaloides totales obtenidos por percolación.

CUADRO 4. CUANTIFICACIÓN DE CAFEÍNA POR HPLC DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH-.RIOBAMBA. ENERO DEL 2014.

COMPONENTE	TIEMPO DE RETENCIÓN	ÁREA	ALTURA	CONCENTRACIÓN ppm	PORCENTAJE (%)
Cafeína estándar	7,433	68,0410	2,809	5	100%
Alcaloides totales	7,400	47,6925	2,003	3,54	70,73%

El HPLC es un método de análisis muy sensible al valorar cuantitativamente compuestos a bajas concentraciones.

Determinamos la cantidad de cafeína presente obteniendo como resultado una concentración de 3,54 ppm, en otras palabras, los alcaloides tipo cafeína conforma el 70,7% de los alcaloides totales extraídos del vegetal.

### 3.3.3. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO ULTRAVIOLETA (UV) DE LOS ALCALOIDES TOTALES.

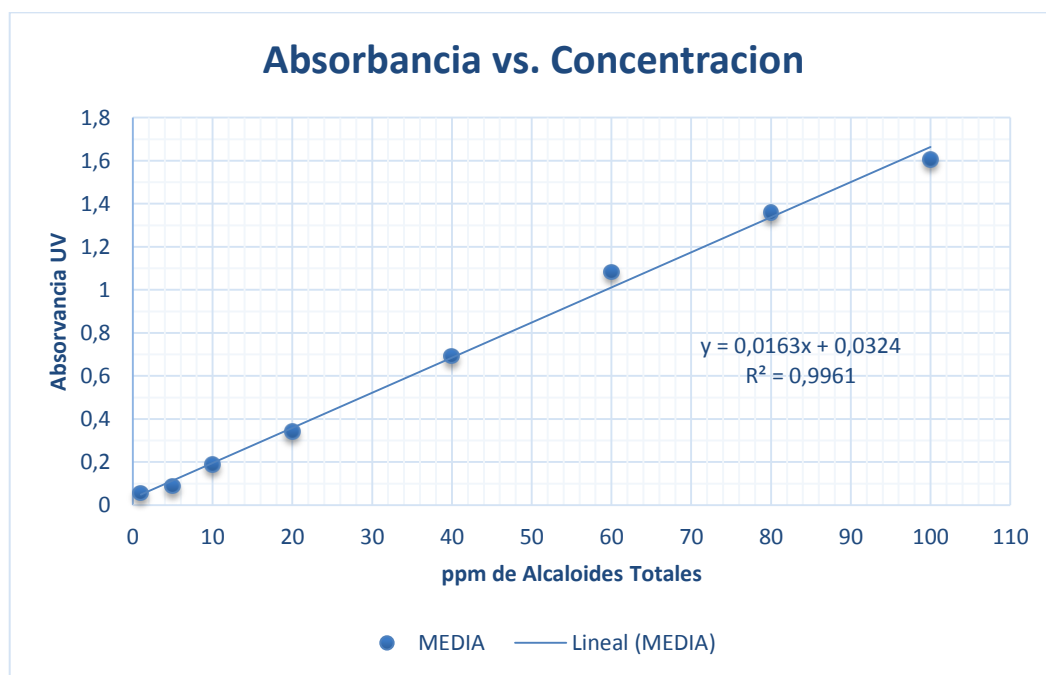
A partir de la fracción alcaloidea concentrada se realizaron diluciones de 1ppm, 5ppm, 10ppm, 20ppm, 40ppm, 60ppm, 80ppmm, y 100ppm para construir la curva de calibración por triplicado, que nos servirá de referencia para cuantificar los alcaloides microencapsulados y ensayos de disolución.



CUADRO 5. ABSORBANCIAS OBTENIDAS A PARTIR DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES.

CONCENTRACIÓN (ppm)	ABSORBANCIA			
	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MUESTRA 3	MEDIA
1	0,0570	0,0540	0,0560	0,05566667
5	0,0885	0,0880	0,0895	0,08866667
10	0,1940	0,1830	0,1850	0,18733333
20	0,3370	0,3460	0,3450	0,34266667
40	0,7010	0,6850	0,6910	0,69233333
60	1,0820	1,0830	1,0850	1,08333333
80	1,3565	1,3695	1,3520	1,35933333
100	1,6040	1,6070	1,6060	1,60566667

GRÁFICO 2. CURVA DE ABSORBANCIA Vs CONCENTRACIÓN DE ALCALOIDES TOTALES. LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO DEL 2014.



### 3.4. CARACTERIZACIÓN DE MICROCÁPSULAS

#### 3.4.1. ENSAYO DE RENDIMIENTO

Se elaboraron microcápsulas sin principio activo como ensayo para identificar la combinación con el mejor rendimiento. Las soluciones de alginato de sodio se elaboraron en un volumen de 100 ml a diferentes porcentajes de concentración, y el cloruro de calcio en soluciones al 3 % en un volumen de 100 ml.

CUADRO 6. ENSAYOS DE PRODUCCIÓN SIN PRINCIPIO ACTIVO Y EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO DEL 2014.

LOTE	ALGINATO DE SODIO (%)	CLORURO DE CALCIO (%)	MICRO CÁPSULAS TEÓRICA (g)	MASA DE MICROCÁPSULAS				
				PRACTICAS (g)				Rendi miento
				Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Media	
Lote 1	1	3	4	1,6841	1,7233	1,6954	1,70093	42,5%
Lote 2	1,4	3	4,4	2,6011	2,5995	2,6331	2,61123	59,3%
Lote 3	1,8	3	4,8	3,2897	3,2881	3,2783	3,28537	68,4%
Lote 4	2	3	5	3,5881	3,5798	3,5455	3,57113	71,4%
Lote 5	2,5	3	5,5	3,9987	3,8879	4,1009	3,99583	72,7%

Tomamos los lotes 4 y 5 por tener el mejor rendimiento de producción de 71.4% y 72.7% respectivamente, y proseguimos a realizar las microcápsulas incluyendo los alcaloides totales como principio activo.

### 3.4.2. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Se determinó la humedad solo de los lotes de interés, y se realizó por triplicado, los valores corresponden a las medias de pesaje.

CUADRO 7. PORCENTAJE DE HUMEDAD POR PERDIDA EN DESECACIÓN DE MICROCÁPSULAS CON LA FRACCIÓN ALCALOIDEA. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO DEL 2014.

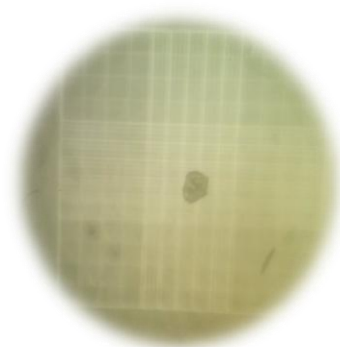
LOTE	MASA DE MICROCÁPSULAS INICIAL (g)	MASA DE MICROCÁPSULAS FINAL (g)	HUMEDAD %
Lote 4	2,0012	1,9856	0,78
Lote 5	2,0022	1,9901	0,60

Las microcápsulas tienen un porcentaje de humedad menor al 1% lo que les brinda una gran estabilidad. Farmacopea (14)

### 3.4.3. MORFOLOGÍA Y TAMAÑO DE PARTÍCULA

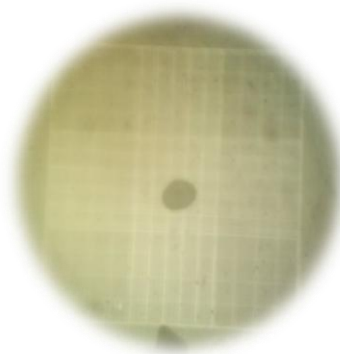
Utilizando un microscopio Olympus CX31 con un aumento de 40x fue suficiente para determinar su forma y tamaño.

FOTOGRAFÍA 2. MICROCÁPSULA AL 2 % DE ALGINATO DE CALCIO QUE CONTIENE ALCALOIDES TOTALES.



Tiene una morfología irregular con un tamaño aproximado menor a 200  $\mu\text{m}$ .

FOTOGRAFÍA 3. MICROCÁPSULA AL 2,5 % DE ALGINATO DE CALCIO QUE CONTIENE ALCALOIDES TOTALES.



Tiene una morfología irregular pero más uniformes que las anteriores con un tamaño aproximado menor a 250  $\mu\text{m}$ .

Las Fotografías 2 y 3 muestran el tamaño original de las microcápsulas obtenidas por este método, pero se puede reducir aún más su tamaño si las sometemos a una trituration donde las partículas conseguidas todavía seguirán teniendo la cobertura de alginato y en su interior el principio activo.

#### 3.4.4. RENDIMIENTO DE PRODUCCIÓN

Por los ensayos realizados anteriormente solo utilizamos los lotes 4 y 5 as que comprobamos su rendimiento en acción, es decir, para contener a los alcaloide totales de la *Ilex guayusa* L.

CUADRO 8. ENSAYOS DE PRODUCCIÓN CON PRINCIPIO ACTIVO Y EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO DEL 2014.

LOTE	ALC. TOTALES (mg)	MICROCAP. TEÓRICA (g)	MASA DE MICROCÁPSULAS PRACTICAS (g)					RENDIMIENTO (%)
			ENSAYO 1	ENSAYO 2	ENSAYO 3	MEDIA		
Lote 4	500	5,500	5,1914	5,1904	5,1891	5,1903	94,4%	
Lote 5	550	6,050	5,8781	5,8992	5,9025	5,8933	97,4%	

Si comparamos con los ensayos iniciales podemos observar un incremento en el rendimiento al ser añadido el principio activo, es decir, un efecto de potenciación.

### 3.4.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DEL PRINCIPIO ACTIVO

Se determinó el contenido real de alcaloides totales contenido por gramos de microcápsulas.

CUADRO 9. CONCENTRACIÓN DEL CONTENIDO DE ALCALOIDES TOTALES. LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO DEL 2014.

LOTE	ALC. TOTALES	CONC. TEÓRICA (mg/g)	ABSORBANCIA DE MUESTRAS				CONC. PRÁCTICA (ppm)	CONC. PRÁCTICA (mg/g)
			ENSAYO	ENSAYO	ENSAYO	MEDIA		
			1	2	3			
Lote 4	500mg/5g	100,0	0,397	0,398	0,398	0,3977	22,388	74,62
Lote 5	550mg/5, 5g	100,0	0,465	0,468	0,469	0,4673	26,654	88,85

Los análisis determinaron que las microcápsulas elaboradas con alginato de sodio al 2% y al 2,5% poseen una concentración de alcaloides totales de 74, 62 mg/g y 88,85 mg/g respectivamente.

### 3.4.6. EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN

Se determinó la capacidad de microencapsulación del complejo alginato de calcio de la fracción alcaloidea de la *Ilex guayusa* L.

CUADRO 10. EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN DE ALCALOIDES TOTALES. LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. ENERO DEL 2014.

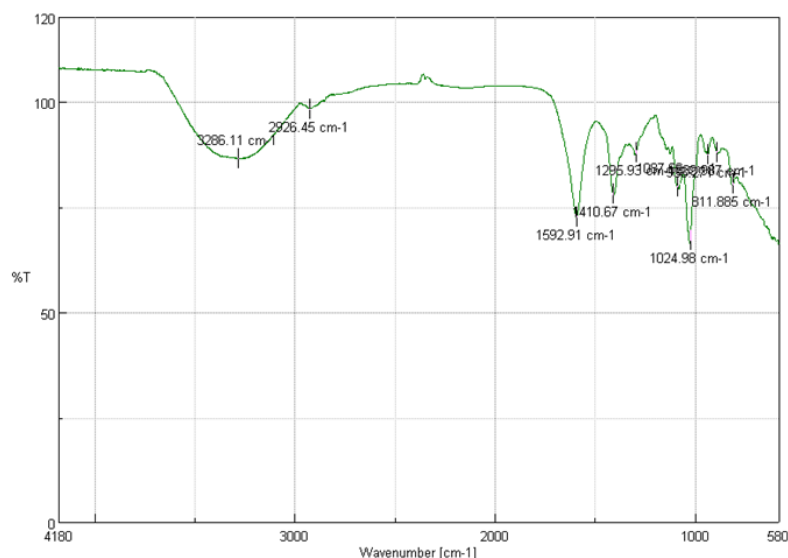
LOTE	ALC. TOTALES	CONC. TEÓRICA (mg/g)	CONC. PRÁCTICA (mg/g)	EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN
Lote 4	500mg/5g	100,0	74,62	74,6%
Lote 5	550mg/5,5g	100,0	88,8533	88,9%

El lote 5 posee una mejor eficiencia de microencapsulación con el 88,9% ante el lote 4 que solo posee una eficiencia del 74,6%; ciertamente debido a que el lote 5 posee una mayor cantidad de alginato de sodio en su fórmula favoreciendo la adecuada encapsulación del principio activo.

### 3.4.7. ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Para identificar los grupos funcionales del alginato de calcio, de los alcaloides totales y de las microcápsulas que contienen la fracción alcaloides se determinó la transmitancia de sus grupos funcionales por espectroscopia IR.

GRÁFICO 3. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DE MICROCÁPSULAS DE ALGINATO DE SODIO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JUNIO DEL 2014.



CUADRO 11. BANDAS DE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DE MICROCÁPSULAS DE ALGINATO DE SODIO. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JUNIO DEL 2014.

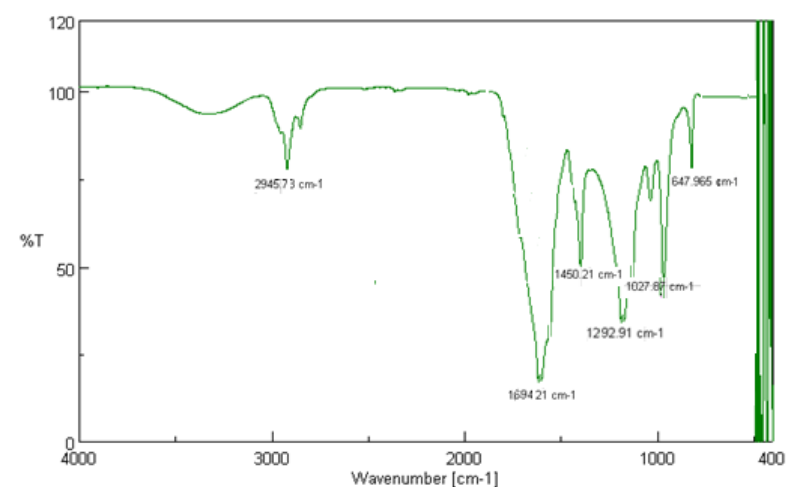
BANDAS DE INFRARROJO		ALGINATO DE
$\lambda$ (cm <sup>-1</sup> )	GRUPO FUNCIONAL	SODIO (cm <sup>-1</sup> )
3400 - 3200	OH	3286.11
2950 - 2900	C-H	2926.45
1650 - 1550	C-O	1592.91
1420 - 1200	C-O-H-C-	1410.67 - 1295.93
1300 - 1000	C-O-C	1024.98 - 1086.66
1000 - 800	C-C-H	811.88

La longitud de onda 3286.11 cm<sup>-1</sup> pertenece a los grupos funcionales hidroxilo, éter y carboxílicos; el pico de transmitancia 1592.91 cm<sup>-1</sup> representa los alcoholes alifáticos con grupo carbonilo, estos dos puntos son característicos del alginato de sodio.

El resto de bandas pertenecen a las vibraciones producidas por cadenas de carbono ya que se trata de un compuesto de origen orgánico.<sup>54</sup>

<sup>54</sup> DAEMI, H. et al. (2012). Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles, 12 p.

GRÁFICO 4. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DE ALCALOIDES TOTALES DE *Ilex guayusa* L. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JUNIO DEL 2014.



CUADRO 12. BANDAS DE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DE ALCALOIDES TOTALES DE *Ilex guayusa* L. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JUNIO DEL 2014.

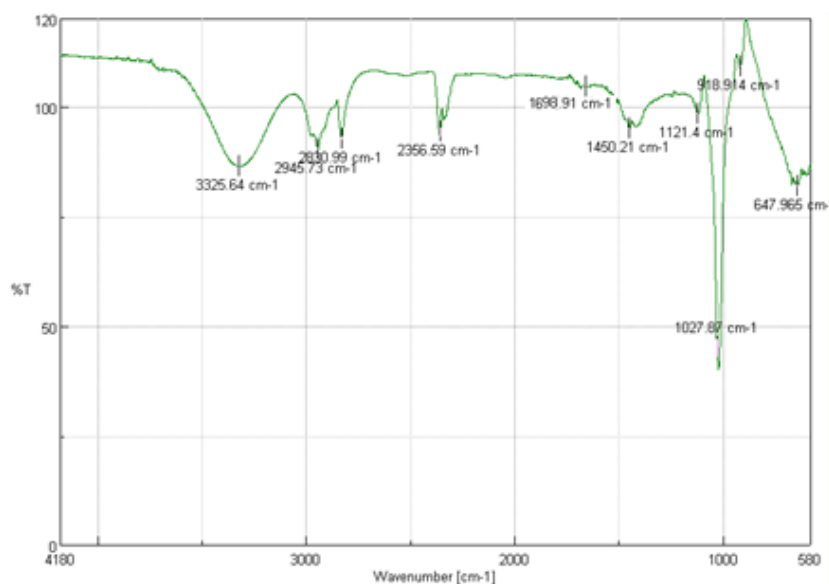
BANDAS DE INFRARROJO		CAFEÍNA
$\lambda$ (cm <sup>-1</sup> )	GRUPO FUNCIONAL	(cm <sup>-1</sup> )
2950 - 2900	C-H	2945.73
1760 - 1690	C=O	1694.21
1650 - 1550	C-O	1450.21
1360 - 1290	C-N	1292.91
1300 - 1000	C-O-C	1027.67
800 - 600	C-H (aromáticos)	647.96

Las bandas más representativas son las de 647.96 cm<sup>-1</sup> distintivas de grupos aromáticos (anillos), de 1694.21 cm<sup>-1</sup> del grupo de las cetonas y la de 1292.91 cm<sup>-1</sup> que establece la presencia de aminas; estos elementos conforman los grupos funcionales que conforman los alcaloides, que en este caso, la existencia de cafeína que es el compuesto mayoritario de la fracción alcaloidea de la *Ilex guayusa* L. <sup>55</sup>

<sup>55</sup> DURST, B.; GOKEL, G. (2007). Química orgánica experimental, pp. 68-75



GRÁFICO 5. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DE MICROCÁPSULAS CON LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE *Ilex guayusa* L. LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JUNIO DEL 2014.



CUADRO 13. BANDAS DE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DE MICROCÁPSULAS CON LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE *Ilex guayusa* L. LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JUNIO DEL 2014.

BANDAS DE INFRARROJO		MICROCÁPSULAS
$\lambda$ (cm <sup>-1</sup> )	GRUPO FUNCIONAL	CON CAFÉINA (cm <sup>-1</sup> )
3400 - 3200	OH	3325.64
2950 - 2900	C-H	2945.73 - 2830.99
2820 - 2270	C=H (aldehídos)	2356.59
1760 - 1690	C=O	1698.91
1650 - 1550	C-O	1450.21
1300 - 1000	C-O-C	14121.4 - 1027.87
800 - 600	C-H (aromáticos)	647.96

La tenencia de bandas características pertenecientes tanto al alginato como a la cafeína establece la compatibilidad de estos dos elementos, es decir, el alginato cumple su función de recubrir el principio activo sin la necesidad de reaccionar o formar complejos con los alcaloides.

### 3.5. CONTROL DE CALIDAD DE FORMA SOLIDA DE DOSIFICACIÓN.

Se requiere determinar la uniformidad de dosis de las cápsulas y comprobar las propiedades de liberación de las microcápsulas de alginato de sodio. Previamente se realizó un ensayo de capacidad de contenido donde nuestras cápsulas blandas de gelatina pueden tener en su interior un máximo de 400mg de microcápsulas.

#### 3.5.1. UNIFORMIDAD DE CONTENIDO

Se realizaron correcciones según el porcentaje de eficacia de encapsulación para contener 40 mg de alcaloides totales de *Ilex guayusa* L., en 400 mg de microcápsulas.

CUADRO 14. UNIFORMIDAD DE CONTENIDO DE ALCALOIDES TOTALES DE MICROCÁPSULAS OPTIMIZADAS. LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JUNIO DEL 2014.

LOTE	CONC.	ABSORBANCIA DE MUESTRAS				CONC.	CONC.	EFICIENCIA (%)
	TEÓRICA					PRÁCTICA	PRÁCTICA	
	(mg/g)	ENSAYO 1	ENSAYO 2	ENSAYO 3	MEDIA	(ppm)	(mg/g)	
<b>Lote 4</b>	100,0	0,387	0,392	0,473	0,417	23,57	94,28	94,3%
<b>Lote 5</b>	100,0	0,450	0,468	0,491	0,470	26,81	107,24	107,2%

#### 3.5.2. UNIFORMIDAD DE MASA.

a) Uniformidad de masa de microcápsulas del lote 4.

Cada cápsula blanda de gelatina vacía tiene un peso medio de 0,0780 g

Se pesaron 10 capsulas cuyo masa total es 4,7897 g

CUADRO 15. UNIFORMIDAD DE MASA DE CÁPSULAS DE GELATINA LOTE 4. LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JUNIO DEL 2014.

LOTE 4					
Nº	MASA DE CÁPSULAS	MASA DE CÁPSULAS DE GELATINA	MASA DE MICROCÁPSULAS (X)	Xmed	DESVIACIÓN (%)
1	0,4790	0,078	0,4010	0,4010	0,01
2	0,4803	0,078	0,4023	0,4010	0,33
3	0,4799	0,078	0,4019	0,4010	0,23
4	0,4733	0,078	0,3953	0,4010	1,41
5	0,4809	0,078	0,4029	0,4010	0,48
6	0,4798	0,078	0,4018	0,4010	0,21
7	0,4811	0,078	0,4031	0,4010	0,53
8	0,4796	0,078	0,4016	0,4010	0,16
9	0,4759	0,078	0,3979	0,4010	0,77
10	0,4799	0,078	0,4019	0,4010	0,23
<b>Total=</b>	<b>4,7897</b>		<b>4,0097</b>		

n= 10

Promedio (Xmed)= 0,4010

La desviación obtenida por cada una de las cápsulas no supera el 7,5%; según la farmacopea española aprobamos el lote 4.

b) Uniformidad de masa de microcápsulas del lote 5.

Cada capsula vacía tiene un peso medio de 0,0780 g

Se pesaron 10 capsulas cuyo masa total es 4,795 g

CUADRO 16. UNIFORMIDAD DE MASA DE CAPSULAS DE GELATINA LOTE 5. LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. MARZO DEL 2014.

LOTE 5					
Nº	MASA DE CÁPSULAS	MASA DE CÁPSULAS DE GELATINA	MASA DE MICROCÁPSULAS (X)	Xmed	DESVIACIÓN (%)
1	0,4820	0,078	0,4040	0,4014	0,65
2	0,4793	0,078	0,4013	0,4014	0,02
3	0,4789	0,078	0,4009	0,4014	0,12
4	0,4709	0,078	0,3929	0,4014	2,11
5	0,4822	0,078	0,4042	0,4014	0,70
6	0,4798	0,078	0,4018	0,4014	0,10
7	0,4799	0,078	0,4019	0,4014	0,13
8	0,4798	0,078	0,4018	0,4014	0,10
9	0,4811	0,078	0,4031	0,4014	0,43
10	0,4799	0,078	0,4019	0,4014	0,13
<b>TOTAL=</b>	<b>4,7938</b>		<b>4,0138</b>		

n= 10

Promedio (Xmed)= 0,4014

Aprobamos el lote 5 porque cumple con la normativa de la Farmacopea Española al poseer desviaciones menores al 7,5%.

### 3.5.3. ENSAYO DE DISOLUCIÓN

El ensayo de disolución permite el identificar de manera general el mecanismo de liberación permitiéndonos evaluar el comportamiento de las microcápsulas, para lo cual se realizó el análisis utilizando únicamente el lote 5 ya que son las microcápsulas con los mejores resultados obtenidos.

El ensayo de disolución se realizó a pH 2,0 y pH 7,4 siguiendo las especificaciones técnicas para asegurar la obtención de un perfil de disolución predeterminado y reproducible.

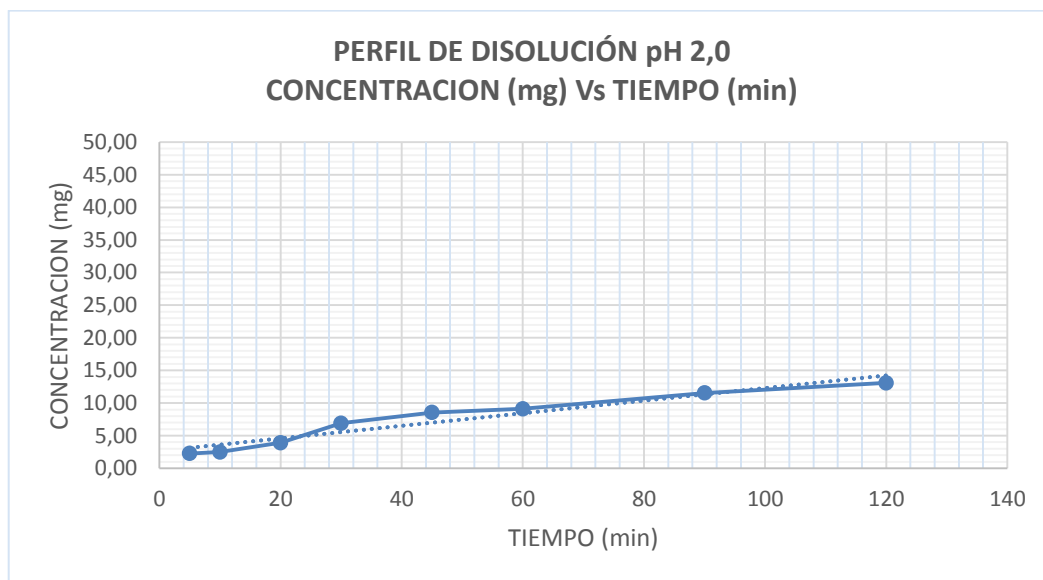
### 3.5.3.1. ENSAYO DE DISOLUCIÓN EN pH 2,0

Se tomaron muestras del ensayo de disolución a intervalos de tiempo de 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min, 120 min.

CUADRO 17. ENSAYO DE DISOLUCIÓN EN TAMPÓN pH 2,0 DE CAPSULAS DE GELATINA CON LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE *Ilex guayusa* L., DEL LOTE 5. LABORATORIO DE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JUNIO DEL 2014.

N°	TIEMPO (min)	ABSORCIÓN	CONCENTRACIÓN (ppm)	CONCENTRACIÓN (mg)
1	5	0,053	1,26	2,27
2	10	0,055	1,38	2,49
3	20	0,068	2,18	3,92
4	30	0,095	3,83	6,90
5	45	0,110	4,75	8,56
6	60	0,115	5,06	9,11
7	90	0,137	6,41	11,54
8	120	0,151	7,27	13,08

GRÁFICO 6. PERFIL DE DISOLUCIÓN A pH 2,0 DE MICROCÁPSULAS DE ALGINATO DE CALCIO CON FRACCIÓN ALCALOIDEA. LABORATORIO DE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JUNIO DEL 2014.



Observamos que no existe una liberación completa del principio activo incluso al término del ensayo tras los 120 minutos demostrando que las microcápsulas con alginato de sodio poseen la propiedad de protección gastroentérica.

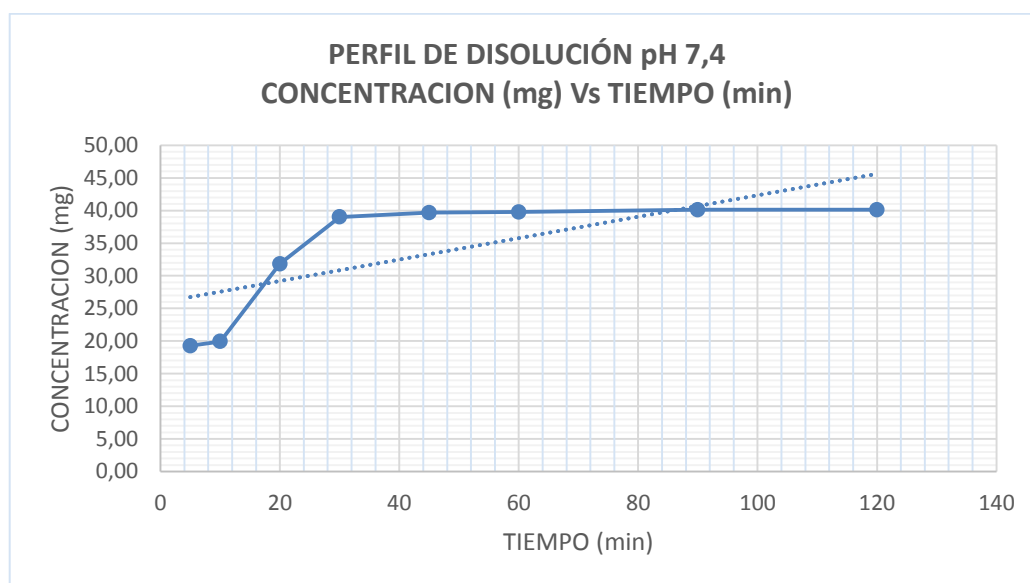
#### **3.5.3.2. ENSAYO DE DISOLUCIÓN EN pH 7,4**

Se tomaron muestras del ensayo de disolución a intervalos de tiempo de 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min, 120 min.

CUADRO 18. ENSAYO DE DISOLUCIÓN EN TAMPÓN pH 7,4 DE CAPSULAS DE GELATINA CON LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE *Ilex guayusa* L., DEL LOTE 5. LABORATORIO DE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JUNIO DEL 2014.

Nº	TIEMPO (min)	ABSORCIÓN	CONCENTRACIÓN (ppm)	CONCENTRACIÓN (mg)
1	5	0,207	10,70	19,26
2	10	0,213	11,07	19,92
3	20	0,321	17,69	31,84
4	30	0,386	21,67	39,01
5	45	0,392	22,04	39,67
6	60	0,393	22,10	39,78
7	90	0,396	22,28	40,11
8	120	0,396	22,28	40,11

GRÁFICO 7. PERFIL DE DISOLUCIÓN A pH 7,4 DE MICROCAPSULAS DE ALGINATO DE CALCIO CON FRACCIÓN ALCALOIDEA. LABORATORIO DE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JUNIO DEL 2014.



Los datos obtenidos demuestran una liberación total al cabo de los 60 minutos, la mitad de tiempo que el realizado en pH gástrico demostrando la predisposición del alginato de sodio para liberar principios activos en medios alcalinos.

### 3.5.3.3. ENSAYO DE DISOLUCIÓN CONTINUO pH 2,0 – pH 7,4

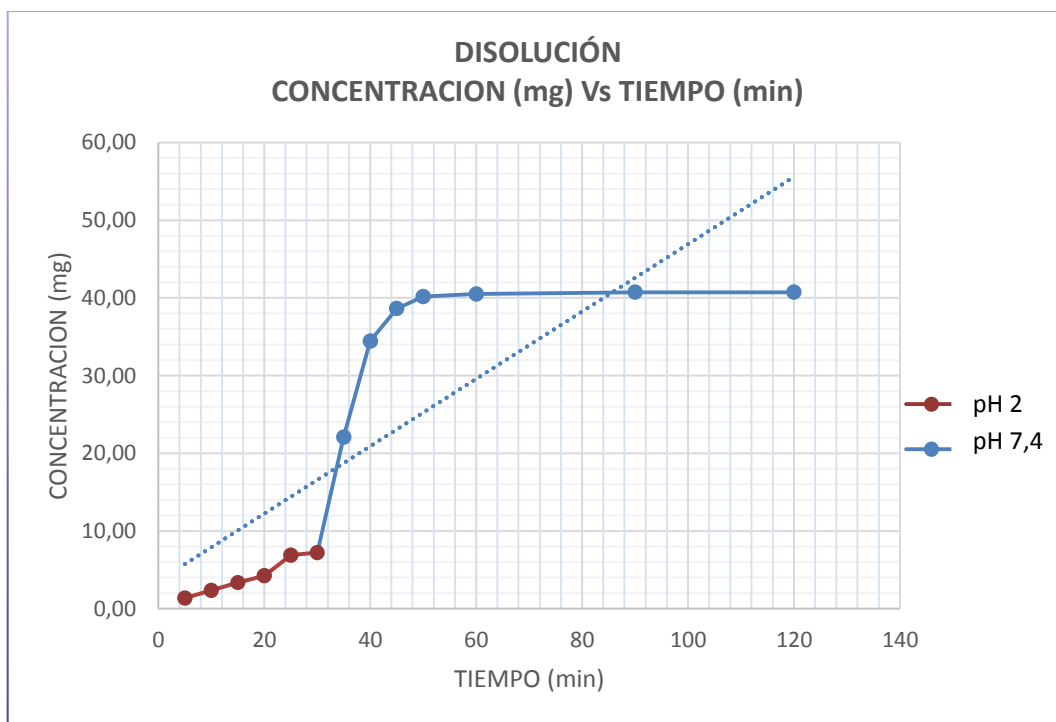
Se tomaron muestras del ensayo de disolución a intervalos de tiempo de 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min, 120 min.

CUADRO 19. ENSAYO DE DISOLUCIÓN CONTINUA EN TAMPÓN pH 2,0 - pH 7,4 DE CAPSULAS DE GELATINA CON LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE *Ilex guayusa* L., DEL LOTE 5. LABORATORIO DE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JUNIO DEL 2014

pH	N°	TIEMPO (min)	ABSORCIÓN	CONCENTRACIÓN (ppm)	CONCENTRACIÓN (mg)
pH 2,0	1	5	0,045	0,77	1,39
	2	10	0,054	1,32	2,38
	3	15	0,063	1,87	3,37
	4	20	0,071	2,36	4,25
	5	25	0,095	3,83	6,90
	6	30	0,098	4,02	7,23
pH 7,4	7	35	0,167	8,25	22,08
	8	40	0,279	15,11	34,44
	9	45	0,317	17,44	38,63
	10	50	0,331	18,30	40,17
	11	60	0,334	18,48	40,50
	12	90	0,336	18,61	40,72
	13	120	0,336	18,61	40,72



GRÁFICO 8. PERFIL DE DISOLUCIÓN CONTINUO CON pH 2,0 - pH 7,4 DE MICROCÁPSULAS CON LA FRACCIÓN ALCALOIDEA. LABORATORIO DE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA. JUNIO DEL 2014.



La gráfica obtenida del ensayo de disolución continua de pH 2 a pH 7,4 nos permite observar el comportamiento de liberación de los alcaloides contenidos en las microcápsulas donde el primer período de digestión simulada es la gástrica y el fármaco no libera en totalidad su contenido. El segundo período simulado es el intestinal que después de haber pasado por la solución ácida el fármaco libera de manera resuelta los 40mg de alcaloides totales en un tiempo más corto al realizarse el ensayo por separado.

## CONCLUSIONES

1. Las microcápsulas compuestas por la fracción alcaloidea de *Ilex guayusa Loess* fueron elaboradas mediante gelificación iónica externa con una metodología simple y reproducible que podría ser adaptada a escala industrial, las cuales tomaron forma farmacéutica de cápsulas blandas de gelatina como medio de dosificación sólida que cumplió con los ensayos de control de calidad.
2. Se realizó el control de calidad de la droga cruda de *Ilex guayusa Loess*, y se determinó que los parámetros considerados se encontraban dentro de las normativas, CUADRO 2; de igual manera sobrevino con los análisis realizados a los extractos del vegetal donde se constató la única presencia de la fracción alcaloidea y no de otros componentes, CUADRO 3.
3. Por cromatografía en capa fina (TLC) del extracto de guayusa se estableció la presencia de alcaloides tipo xantinas que se cotejó con el estándar de cafeína con  $R_f$  0.57 para ambas muestras, y mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se identificó a la cafeína como marcador fitoquímico de la fracción alcaloidea de la *Ilex guayusa Loess* que constituye el 70,7% de la composición alcaloidea total del vegetal.
4. Tras modificaciones de tecnología farmacéutica se consiguieron resultados acorde a las normativas de la Real Farmacopea Española sobre los ensayos de caracterización de las microcápsulas por gelificación iónica externa, estableciendo una metodología asequible y segura de realizar garantizando el mismo resultado cada vez.
5. El control de calidad de las cápsulas blandas de gelatina muestran tener uniformidad de masa, uniformidad de contenido, y el perfil de disolución utilizando medios de pH 2,0 y pH 7,4 nos da los resultados deseados por la investigación, donde se observa un comportamiento de gastroprotección por parte del recubrimiento algínico, a la vez de una liberación modificada influida directamente por el pH del medio, donde, la ventana de absorción deseada va hacer la intestinal a pH 7,4 lugar idóneo de absorción de los alcaloides.

## RECOMENDACIONES

1. Se debe tomar en cuenta las diferentes estaciones de recolección de la *Ilex guayusa* L., para garantizar la obtención de una mayor concentración de alcaloides.
2. Las microcápsulas realizadas en esta investigación fueron elaboradas con alginato de sodio al 70%, la reproducibilidad puede variar si cambiara ésta concentración de pureza.
3. La fracción alcaloidea se debe almacenar en un frasco color ámbar, colocado en un lugar fresco para evitar la degradación y la contaminación de los metabolitos.
4. Realizar el estudio en animales de experimentación y un análisis toxicólogo de las microcápsulas con la fracción alcaloidea de la *Ilex guayusa* Loess para determinar si existiese alguna contraindicación, y lograr en algún momento poder utilizarlo en personas.

## BIBLIOGRAFÍA

- **AULTON, M.** La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. 2. ed., Madrid-España. Elsevier. 2004, pp. 22-32.
- **BELITZ, H.** Química de los alimentos. 2. ed. Zaragoza-España. Acriba. 1997, pp. 150.
- **BRITTANIE M. et al.** An overview on caffeine. (Nutrition and enhanced sports performance), Vol 1, N° 51. (Estados Unidos), pp. 487- 495. Agosto 2013.  
<https://www.elsevier.com/books/nutrition-and-enhanced-sports-performance/bagchi/978-0-12-396454-0>  
02-05-2014
- **CORREA, Q.** Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andres Bello. Colombia-Bogotá. Guadalupe. 1989, pp. 44-51.
- **CHANCARI A., Jorge. et al.** Estudio sobre la taxonomía y estado de conservación de la guayusa (*Ilex guayusa Loess*) del Cantón Pastaza. Pastaza-Ecuador. ESPOCH, Herbario. 2007, pp. 4.  
<http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/767>  
02-05-2014
- **DAEMI, H. et al.** Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles. 6. ed. Sharif-Iran. University of Technology. 2012, 12 p.
- **DRAGET, K.** Handbook of hydrocolloids-alginates. Cambridge-England. Woodhead. 2000, pp. 1-19.
- **DURST, B.; GOKEL, G.** Química orgánica experimental. Barcelona-España. Reverté. 2007, pp. 68-75
- **REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA.** Coedición de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. (Norma). 3. ed. Madrid-España. 2005. pp. 247-289.

- **FANGER, G. et al.** Microencapsulation processe and applications. New York-Estados Unidos. Plenum. 1974, pp. 245-265.
- **FLÓREZ, J.** Farmacos y dolor. Madrid-España. Farmacología Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria Santander. 2004, pp. 35-61.
- **BEHAV B.** Caffeine neuroprotective effects on 6-OHDA-lesioned rats are mediated by several factors, including pro-inflammatory cytokines and histone deacetylase inhibitions. (Elsevier), Vol. 10, N° 1016, pp. 116-125. Febrero 2014.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24525422>
- **FUNAMI, T. et al.** Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and calcio binding. (Food Hydrocolloids), Vol. 23, N° 7, pp. 1746-1755. Octubre 2009.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X09000484>  
06-06-2014
- **GOMBOTZ, WR.** Protein release from alginate matrices. (Advanced Drug Delivery Reviews), Vol. 4, N°31, (Estados Unidos), pp. 267-285. Mayo 1998.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837629>  
06-06-2014
- **HELGERUD, T. et al.** In food stabilizers, thickeners and gelling agents, alginates. United Kingdom-Estados Unidos. Blackwell. 2010. pp. 34-56.
- **INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN.** Control de calidad de productos naturales de uso medicinal. (Norma). Quito-Ecuador. ministerio de salud publica. 1999, 21p.
- **ITZIK, A.** Las plantas curativas sanan desde siempre. Bogota-Colombia. Arquetipo. 2007, pp. 230-240.
- **JORGENSEN, P. et al.** Catalogue of the vascular plants of Ecuador. (Missouri Botanical Garden), Vol. 75, (Estados Unidos), pp. 225-227, Febrero 1999.

- **LAMAS M. et al.** Hydrogel microspheres for flutamide obtained by múltiple emulsions. Paris-Francia. Santé. 1998, Vol. 6. Pharma Science. 1998, pp. 375-378.
- **VALDÉS L., Oscar.** Diseño de soportes combinados a base de polímeros naturales y sintéticos para su evaluación en cultivos celulares y la liberación de principios activos. (Tesis). (M. Sc. Ciencias), Universidad de la Habana, Centro de Biomateriales. La Habana-Cuba. 2005, pp. 2-155.
- **LÓPEZ G., Gema.** Diseño de formas farmacéuticas líquidas de liberación modificada para el tratamiento del dolor. (Tesis). (Quim. Farm.), Universidad de Granada, Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Granada-España. 2007, pp. 143-153.
- **LOPEZ C., Lya C.; VILLALTA H, Marvin A.,** Propuesta de un método para la elaboración de microesferas matriciales de ácido acetilsalicílico utilizando alginato de sodio por la técnica de gelificación iónica. (Tesis). (Quim. Farm.), Universidad del Salvador, Facultad Química y Farmacia. San Salvador-El Salvador. 2009, pp. 29.
- **LOPRETTI, M. et al.** Microencapsulación de compuestos de actividad biológica. Montevideo-Uruguay. INN TEC, 2007. pp. 19.
- **MIRANDA, M. et al.** Evaluación farmacognóstica y fitoquímica preliminar de *hyllanthus rbicularis* HBK. (Scielo), Vol. 34, N°1. (Cuba), pp. 56-62. Abril 2000.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152000000100008&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152000000100008&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 1561-2988.  
10-06-2014
- **MURILLO, O. et al.** Liberación controlada de principios activos mediante el empleo de formulaciones galénicas. (Universidad de Navarra), Vol. 45, N° 4. (España), pp. 3-5. Octubre-Diciembre 2001.  
[http://www.unav.es/revistamedicina/45\\_4/default.html](http://www.unav.es/revistamedicina/45_4/default.html)  
10-06-2014

- **OBIDIKEA, I. et al.** Microencapsulation enhances the anti-ulcerogenic properties of *Entada africana* leaf extract. (Journal of Ethnopharmacology), Vol 137, N°1. (India), pp. 553-561. Septiembre 2011.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111004296>  
10-06-2014
- **ORRÚ, M. et al.** Psychostimulant pharmacological profile of paraxanthine, the main metabolite of caffeine in humans. (Neuropharmacology), Vol 67, N°1. (Estados Unidos), pp. 476- 484. Abril 2013.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002839081200576X>  
20-06-2014
- **PACHA J., Ana G.** Comprobación del efecto adelgazante de la tintura de guayusa (*Ilex guayusa*) en ratones (*Mus musculus*) con sobrepeso inducido. (Tesis). (Bioq. Farm.), ESPOCH, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobmab-Ecuador. 2012, pp. 5-8.
- **PARK, P. et al.** Biodegradable hydrogels for drug delivery. (Advanced drug delivery), Vol. 11, N°5. (Estados Unidos), pp. 59-84. Agosto 1993.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0169409X93900272>  
20-06-2014
- **PONCELET, D. et al.** Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. (Bioartificial organs), Vol.3, N°1. (Estados Unidos), pp. 39-45. Junio 1992.
- **SHARAPIN, N. et al.** Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Bogotá-Colombia. CAB-RIPROFITO. 2000, pp. 63-81.
- **SKOOG, D. et al.** Principios de análisis instrumental. 5. ed. MAdrid-España. Mc Graw Hill. 2001, pp. 785-790.
- **SUÑÉ, J.** Nuevas aportaciones galénicas a las formas de administración. Barcelona-España. Ferrer. 2003, pp. 2-10.

- **WAGNER, H. et al.** Plant drug análisis, athing layer chromatography. 2. ed. Munchen-Alemania. Springer. 2001, pp. 24-34, 361.
- **YÁNEZ, F. et al.** Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. (Mundo alimentario), Vol 21. (México), pp. 24-30. Marzo-Abril 2005.  
[http://alimentariaonline.com/PaDs9lu5/wp-content/uploads/MA005\\_microencapsula\\_WSF.pdf](http://alimentariaonline.com/PaDs9lu5/wp-content/uploads/MA005_microencapsula_WSF.pdf)  
 20-06-2014
- **WONG, Y. et al.** Degradation of PEG and non-PEG alginatechitosan microcapsules in different pH environments. (Polymer degradation and stability), Vol. 96, N°12. (Singapore), pp. 2189-2197. Diciembre 2011.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391011003041>  
 07-07-2014
- **YOTSUYANAGI, T. et al.** Calcium-Induced Gelation of Alginic Acid and Ph-Sensitive Reswelling of Dried Gels. (Chem. Pharm. Bull.), Vol.35, N°4. (Japón), pp.1555-1563. Enero 1987.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb1958/35/4/35\\_4\\_1555/article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb1958/35/4/35_4_1555/article)  
 20-07-2014.



## ANEXOS

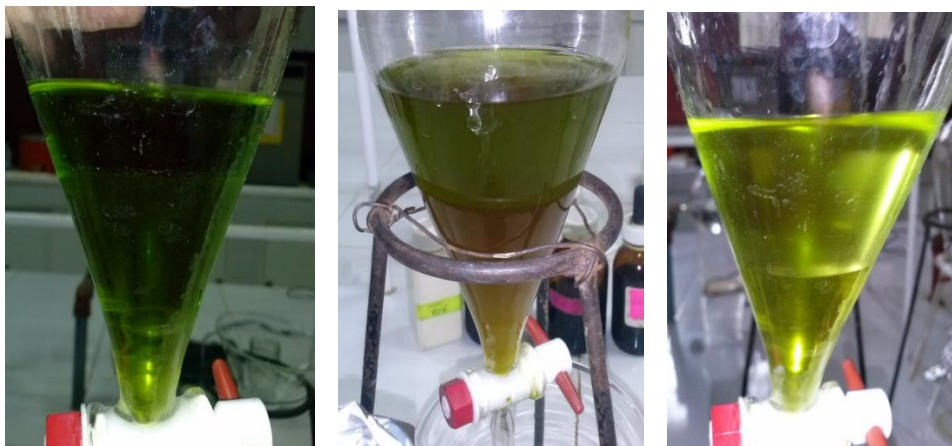
### ANEXO N 1. HOJAS DE *Ilex guayusa* L., SECAS Y PULVERIZADAS.



### ANEXO N 2. EXTRACTOS POR PERCOLACIÓN Y DIGESTIÓN ÁCIDA.



**ANEXO N 3. DESCLOROFILACIÓN DE EXTRACTOS CON CICLO HEXANO.**



**ANEXO N 4. EXTRACCIÓN DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA CON CLOROFORMO.**



**ANEXO N 5. ALCALOIDES TOTALES DE *Ilex guayusa* L.**



## **ANEXO N 6. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA.**



**DRAGENDORFF**  
**BLANCO Y POSITIVO**



**MAYER**  
**BLANCO Y POSITIVO**



**WAGNER**  
**BLANCO Y POSITIVO**



**ENSAYO DE XANTINAS**  
**BLANCO Y POSITIVO**

## **ANEXO N 7. EQUIPO ESPECTROFOTÓMETRO ULTRAVIOLETA UV – HEYIOS THERMO ELECTRON CORPORATION.**





**ANEXO N 8. EQUIPO DE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA - HPLC SHIMADZU LC-10 Ai a 254 nm.**



**ANEXO N 9. EQUIPO DE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA JASCO FT/IR-4100.**



**ANEXO N 10. DISOLUTOR MARCA VANKEL 6010.**



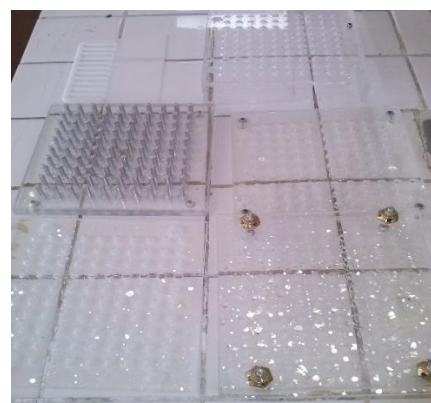
**ANEXO N 11. MICROSCOPIO OLIMPUS CX31.**



**ANEXO N 12. AGITADOR MAGNÉTICO.**



**ANEXO N 13. ENCAPSULADORA MANUAL.**



#### ANEXO N 14. MICROCÁPSULAS DE ALGINATO DE SODIO.



ALGINATO DE SODIO AL 1%



ALGINATO DE SODIO AL 1,4%



ALGINATO DE SODIO AL 1,8%





ALGINATO DE SODIO AL 2%



ALGINATO DE SODIO AL 2,5%

**ANEXO N 15. CÁPSULAS BLANDAS DE GELATINA QUE CONTIENEN LAS MICROCÁPSULAS.**

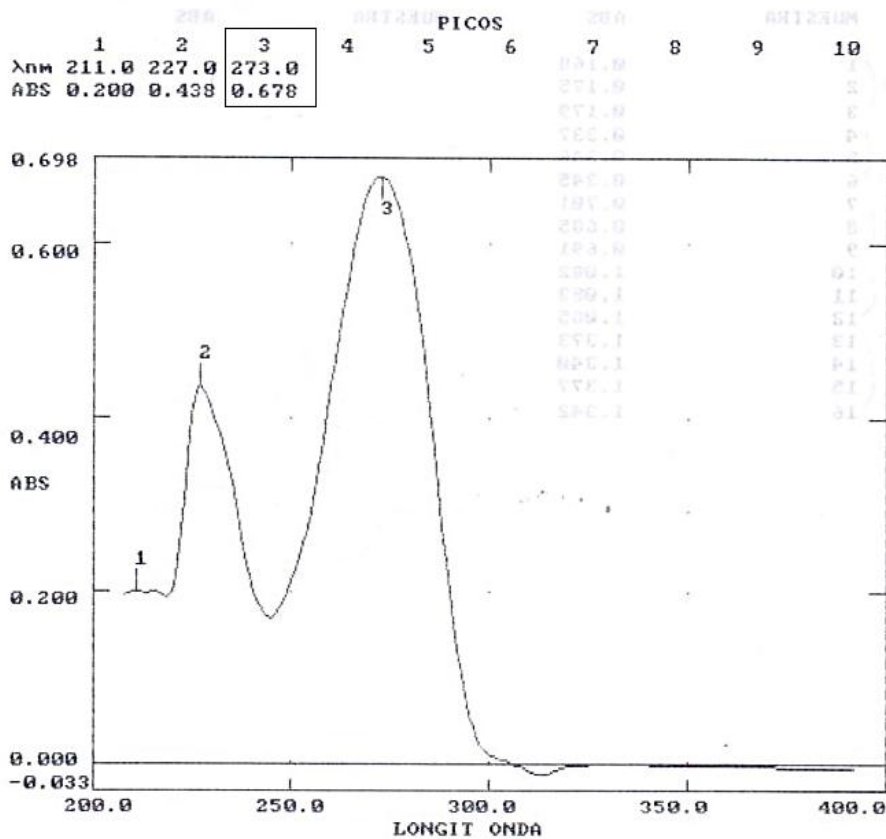


# ANEXO N 16. BARRIDO DE LA FRACCIÓN ALCALOIDEA DE *Ilex guayusa* L.

1. DAT HEXIOSB ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60 PAGI. 1

FECHA:03/02/14 SERIE No:140113 ID : BARRIDO DE LA FRACCION ALCALOIDEA  
HORA :14:48:30 OPERARIO : HERNANDEZ CESAR

TIPO BARR:INTELIGEN VELOC:NORMAL INT DATO:1.0nm  
LIN BASE:USUARIO ANCHOBANDA:2.0nm CAMBIAR LAMP:325nm  
SUAVIZANDO: MEDIO





## ANEXO N 17. CURVA DE CALIBRACIÓN POR ESPECTROSCOPIA UV.

HEXIOS® ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60 PAGI. 1

FECHA:03/02/14 SERIE No:140113 ID : CURVA DE CALIBRACION  
HORA :17:47:40 OPERARIO :HERNANDEZ CESAR

SELEC. λ:SENCILLA ANCHOBANDA:2.0nm INTEGRACION:1s  
CAMBIAR LAMP:325nm TIEMP RETRASO:00:00  
LONG. ONDA:273.0nm

MUESTRA	ABS	MUESTRA	ABS
1	1 ppm	0.057	
2	1 ppm	0.054	
3	1 ppm	0.056	
4	5 ppm	0.085	
5	5 ppm	0.086	
6	5 ppm	0.087	
7	10 ppm	0.220	
8	10 ppm	0.191	
9	10 ppm	0.191	
10	20 ppm	0.337	
11	20 ppm	0.346	
12	20 ppm	0.345	
13	40 ppm	0.701	
14	40 ppm	0.685	
15	40 ppm	0.691	
16	60 ppm	1.082	
17	60 ppm	1.083	
18	60 ppm	1.085	
19	80 ppm	1.291	
20	80 ppm	1.362	
21	80 ppm	1.362	
22	100 ppm	1.604	
23	100 ppm	1.607	
24	100 ppm	1.606	

**ANEXO N 18. DATOS DE ESPECTROSCOPIA UV DE LA CONCENTRACIÓN CONTENIDA DE ALCALOIDES TOTALES DEL LOTE 4 Y LOTE 5.**

HEXIOSA ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60				PAGI. 1
FECHA:26/02/14		SERIE No:140113		ID : LOTE4-LOTE5
HORA :15:57:24		OPERARIO : HERNANDEZ CESAR		
SELEC. λ:SENCILLA		ANCHOBANDA:2.0nm		INTEGRACION:1s
CAMBIAR LAMP:325nm		TIEMP RETRASO:00:00		
LONG. ONDA:273.0nm				
LOTE4				
MUESTRA	ABS	MUESTRA	ABS	
1	0.397			
2	0.398			
3	0.398			
LOTE5				
MUESTRA	ABS	MUESTRA	ABS	
1	0.465			
2	0.468			
3	0.469			

**ANEXO N 19. UNIFORMIDAD DE CONTENIDO POR ESPECTROSCOPIA UV DE ALCALOIDES TOTALES DE MICROCÁPSULAS OPTIMIZADAS DEL LOTE 4 Y LOTE 5.**

HEXIOSA ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60				PAGI. 1
FECHA:21/03/14		SERIE No:140113		ID : LOTE4Y5 OPTIMIZADOS
HORA :15:10:40		OPERARIO : HERNANDEZ CESAR		
SELEC. λ:SENCILLA		ANCHOBANDA:2.0nm		INTEGRACION:1s
CAMBIAR LAMP:325nm		TIEMP RETRASO:00:00		
LONG. ONDA:273.0nm				
LOTE4				
MUESTRA	ABS	MUESTRA	ABS	
1	0.336	ENSAYO 1		
2	0.306	ENSAYO 1		
3	0.202	ENSAYO 1		
4	0.345	ENSAYO 2		
5	0.365	ENSAYO 2		
6	0.468	ENSAYO 2		
7	0.473	ENSAYO 3		
8	0.474	ENSAYO 3		
9	0.365	ENSAYO 3		
LOTE5				
MUESTRA	ABS	MUESTRA	ABS	
1	0.444	ENSAYO 1		
2	0.501	ENSAYO 1		
3	0.406	ENSAYO 1		
4	0.465	ENSAYO 2		
5	0.524	ENSAYO 2		
6	0.417	ENSAYO 2		
7	0.489	ENSAYO 2		
8	0.492	ENSAYO 3		
9	0.492	ENSAYO 3		

## ANEXO N 20. DATOS POR ESPECTROSCOPIA UV DEL ENSAYO DE DISOLUCIÓN pH 2,0.

HEXIOSP ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60 PAGI. 1

FECHA:06/06/14 SERIE No:140113 ID : DISOLUCION pH 2  
HORA :09:13:20 OPERARIO : HERNANDEZ CESAR

SELEC. λ:SENCILLA ANCHOBANDA:2.0nm INTEGRACION:1s  
CAMBIAR LAMP:325nm TIEMP RETRASO:00:00  
LONG. ONDA:273.0nm

MUESTRA	ABS	TIEMP
1	0.053	5 MIN
2	0.055	10 MIN
3	0.068	20 MIN
4	0.095	30 MIN
5	0.110	45 MIN
6	0.115	60 MIN
7	0.151	90 MIN
8	0.189	120 MIN

## ANEXO N 21. DATOS POR ESPECTROSCOPIA UV DEL ENSAYO DE DISOLUCIÓN pH 7,4.

HEXIOSP ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60 PAGI. 1

FECHA:06/06/14 SERIE No:140113 ID : DISOLUCION pH 7.4  
HORA :10:14:46 OPERARIO : HERNANDEZ CESAR

SELEC. λ:SENCILLA ANCHOBANDA:2.0nm INTEGRACION:1s  
CAMBIAR LAMP:325nm TIEMP RETRASO:00:00  
LONG. ONDA:273.0nm

MUESTRA	ABS	TIEMP
1	0.207	5 MIN
2	0.213	10 MIN
3	0.321	20 MIN
4	0.386	30 MIN
5	0.392	45 MIN
6	0.393	60 MIN
7	0.392	90 MIN
8	0.396	120 MIN

## ANEXO N 22. DATOS POR ESPECTROSCOPIA UV DEL ENSAYO DE DISOLUCIÓN CONTINUA pH 2,0 - pH 7,4.

HEXIOSP ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60

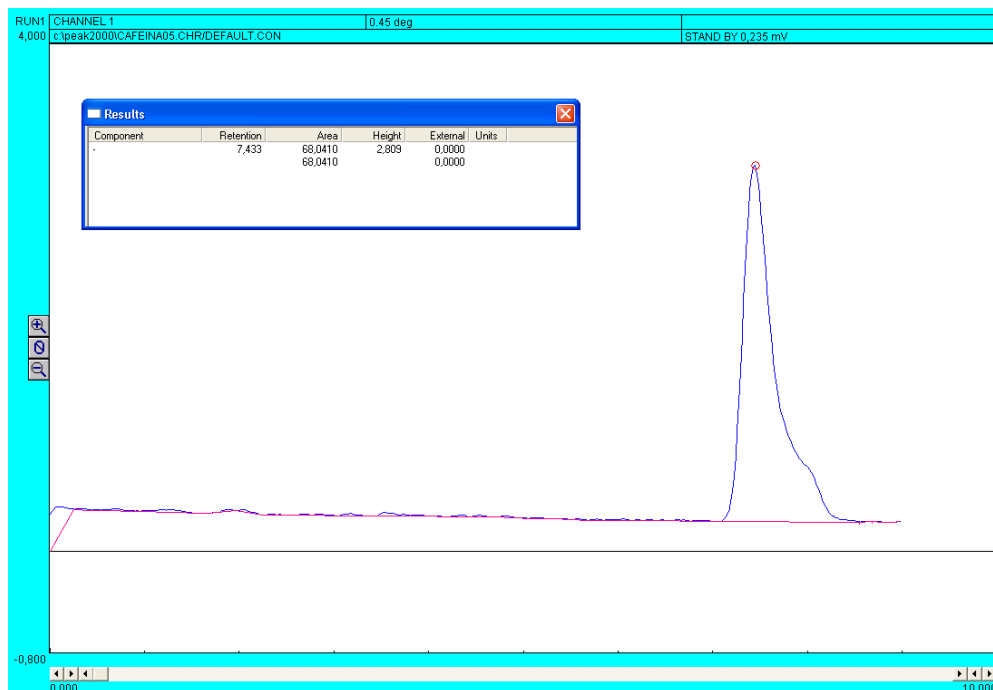
PAGI. 1

FECHA:06/06/14 SERIE No:140113 ID: DISOLUCION CONTINUA pH2 - pH 7.4  
HORA :09:46:44 OPERARIO : HERNANDEZ CESAR

SELEC. λ: SENCILLA ANCHOBANDA:2.0nm INTEGRACION:1s  
CAMBIAR LAMP:325nm RETRASO:00:00  
LONG. ONDA:273.0nm

MUESTRA	ABS	TIEMP
<b>pH 2</b>		
1	0.045	5 MIN
2	0.054	10 MIN
3	0.063	15 MIN
4	0.071	20 MIN
5	0.095	25 MIN
6	0.098	30 MIN
<b>pH 7.4</b>		
1	0.167	35 MIN
2	0.279	40 MIN
3	0.317	45 MIN
4	0.331	50 MIN
5	0.334	60 MIN
6	0.336	90 MIN
7	0.336	120 MIN

## ANEXO N 23. CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC) DE CAFEÍNA ESTÁNDAR.



**ANEXO N 24. CROMATOGRFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)  
DE FRACCIÓN ALCALOIDEA DE *Ilex guayusa* L.**

